

ANNALES
DE
L'INSTITUT PASTEUR

ÉTUDES SUR LA FIÈVRE APHTEUSE

par MM. H. VALLÉE, H. CARRÉ.

(PREMIER MÉMOIRE)

Peu d'infections sont aussi redoutées de l'éleveur que la fièvre aphteuse. Alors même qu'elle sévit sous une forme régulière et bénigne, tandis qu'elle ne provoque qu'une mortalité n'excédant point 2 p. 100 des effectifs, cette maladie représente encore une redoutable contagion. Toutes les espèces de ruminants et le porc s'y montrent sensibles et pour une seule année d'épidémie, c'est par centaines de milliers que se chiffrent les malades. L'immobilisation de ceux-ci, l'amaigrissement et la perte en lait qu'ils subissent, les impedimenta divers de l'épidémie représentaient, avant 1914, un manque à gagner, ou un déficit réel, se chiffrant, selon les estimations, de 56 fr. 25 (Hanovre) à 62 fr. 50 (Angleterre) par tête de malade.

Nocard et Leclainche attestent que les épidémies aphteuses, qui ont sévi sur l'Europe de 1892 à 1902, ne lui ont point coûté moins de 1 milliard 1/2 à 2 milliards de francs. A quel chiffre faudrait-il donc estimer les pertes subies en ces vingt dernières années ?

Une situation aussi grave ne pouvait manquer de retenir l'attention des divers Gouvernements. Tour à tour, l'Allemagne, l'Angleterre, l'Italie, la Hollande... engagent une étude expérimentale de la redoutable épizootie. En France même, dès 1901, sur l'initiative de MM. Roux et Nocard, M. Jean Dupuy, ministre de l'Agriculture, fait ériger sur le domaine de l'École d'Alfort, un laboratoire spécialement aménagé dans ce but (1). Presque sans relâche jusqu'en 1914, l'étude de la fièvre aphteuse s'y poursuit, interrompue seulement en juillet 1914 et bientôt reprise, dès 1920, sur la demande qu'en présentait au Parlement, M. Gast, député de Seine-et-Oise.

Le bilan d'un tel effort international ne se chiffre guère que par de modestes conquêtes si l'on en excepte la notion capitale des virus filtrables introduite dans la science par Löffler et ses collaborateurs à la suite de leurs démonstrations sur le virus aphteux.

Le but essentiel de toutes les tentatives poursuivies : l'obtention d'un procédé d'immunisation fidèle et d'application facile se dérobe toujours. L'accord même n'est point encore réalisé sur la valeur de l'immunité consécutive à une atteinte première de la maladie.

Chemin faisant cependant, à l'exemple de nos collègues étrangers, nous avons enregistré, au cours de nos recherches, des succès partiels ou acquis des précisions sur divers points de l'histoire expérimentale de la maladie. Quelques-uns de ces faits ont été sommairement exposés par nos soins ; ils sont demeurés ignorés du plus grand nombre (2).

Toujours dans l'attente d'une solution prophylactique complète, nous avons différé jusqu'à ce jour la publication de l'ensemble de nos travaux. Une inconnue nous manquait, qui permette de coordonner des résultats expérimentaux d'apparence disparate, quoique minutieusement recherchée. Une

(1) Les recherches y furent poursuivies sous la direction de Nocard jusqu'à sa mort survenue en 1903.

(2) NOCARD, La sérothérapie anti-aphteuse. *Revue générale de Médecine vétérinaire*, 1, 1903, p. 369 ; Rapport au Congrès International de Médecine vétérinaire de La Haye, 1909 (en collaboration avec Leclainche) et *Chroniques scientifiques du « Temps »*, août 1901 ; VALLÉE. Conférence donnée à Lille, in *Bulletin de la Société des Vétérinaires du Nord*, 1911, p. 79 ; ROUX, VALLÉE, CARRÉ et feu NOCARD. *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences*, 173, 1921, p. 1441.

seule notion pouvait expliquer les singularités enregistrées, celle de la *pluralité des virus aphteux*. Nul savant ne paraissait cependant mettre en doute la parfaite unicité du virus aphteux; certains seulement lui attribuaient selon les cas, des degrés fort variables de virulence (Löffler, Terni, Mettam...).

Depuis le début de nos recherches jusqu'à leur suspension en 1914, toutes nos expériences ont été poursuivies avec des virus d'origines très diverses, momentanément entretenus au Laboratoire par passages en série sur le porcelet. Les lymphes ainsi recueillies étaient vite abandonnées tour à tour, car elles semblaient rapidement perdre de leurs qualités originelles. Mieux encore, la plupart de nos épreuves de contrôle de l'immunité, au cours de nos tentatives de vaccination, étaient effectuées à la faveur de virus spécialement introduits au Laboratoire à cette occasion et dont l'origine ne pouvait ainsi manquer d'être distincte de celle des virus d'immunisation.

Pénétrés de la notion de l'existence de *races* diverses du virus aphteux, nous avons eu grand soin, à la reprise de nos recherches en 1920, de bien sérier nos virus selon leur origine. Leur conservation fut assurée au frigorifique comme nous le faisions depuis 1901; mais leur virulence était entretenue par passages successifs sur le bœuf et récolte du sang à l'heure favorable, selon la technique heureusement inaugurée par Cosco et Aguzzi en 1916.

Depuis tantôt huit ans, toutes nos épreuves de contrôle de l'immunité, à la suite de nos tentatives de vaccination, sont effectuées avec le virus même qui est utilisé dans l'essai d'immunisation. Nous avons eu soin de souligner ce fait dans les diverses notes que nous avons publiées depuis ce moment. Grâce à cette précaution, nous avons pu réaliser de très précises constatations sur l'immunité anti-aphteuse et comparer utilement, à la faveur d'expériences d'immunité croisée, divers virus aphteux d'origines distinctes. Disons aussitôt que ces dernières études nous permettent d'affirmer la *pluralité* des virus aphteux et de dégager « l'inconnue » qui nous faisait défaut dans l'interprétation de la première période de nos recherches. C'est à la lumière de ces faits que nous poursuivrons, en divers mémoires, la publication de nos travaux entrepris depuis 1901.

I. — SUR L'IMMUNITÉ ANTI-APHTEUSE.

L'opinion des auteurs classiques doit être rapportée tout d'abord. Dans leur *Traité des Maladies microbiennes*, Nocard et Leclainche écrivent à ce sujet : « De nombreuses observations démontrent l'inconstance de l'immunité acquise ; tandis que certains animaux sont encore réfractaires après sept années, d'autres sont réinfectés après trois semaines. » Pour Hutyra et Marek (1) « l'immunité acquise dure, dans la majorité des cas, plus d'une année (Mazzini, trois, cinq ans ; Schwenck, jusqu'à sept ans). Mais par exception, chez quelques animaux, la maladie récidive après peu de temps. Ainsi, chez le bœuf, Strebler note une réinfection de six à seize semaines après la guérison, Makoldy après douze jours, et Kovacs, sur une porcherie, après dix jours. Waringholz enregistre des récidives, tout d'abord, après quatre mois, puis sur les mêmes bovidés, trois à quatre semaines plus tard sous une forme grave ».

Pour Hecker (2), 99 p. 400 des bovins ont encore l'immunité un an après une première infection et la résistance conférée ne céderait qu'à compter de la troisième année. Casper, dans l'article Fièvre aphteuse du *Manuel de Kolle et Wassermann* (3), présente les mêmes faits et déclare ne pas être capable de fournir des indications plus nettes sur la durée de l'immunité acquise dans la fièvre aphteuse.

Pour Löffler, « la durée de l'immunité varie ; elle dépend de la gravité de l'attaque et de la virulence du principe infectieux » (4).

Rudovsky, en 1914, rapporte des données précises relatives à l'épidémie qui sévit en Moravie de 1910 à 1912. « La maladie en ce délai s'est manifestée sept fois dans une exploitation, six fois dans une autre, cinq fois dans 3 fermes, quatre fois dans 8,

(1) HUTYRA et MAREK. *Spez. Patho. und Therapie der Haustiere*, 6^e édition, 1, 1922, p. 391-392.

(2) HECKER. *VII^e Congrès international de Médecine vétérinaire*, Baden-Baden, 1, 1899, p. 436.

(3) KOLLE et WASSERMANN. *Handbuch der patho. Mikroorganism.*, 2^e édition, 7, p. 214-223.

(4) LÖFFLER. *Congrès de La Haye*, 1909, p. 311.

trois fois dans 22 et deux fois dans 122 exploitations. Dans la moitié des cas, la maladie a fait sa seconde apparition de neuf à treize mois après la première. Dans 29 exploitations, 829 bovidés ont été atteints pour la seconde fois de trois à dix-neuf mois après la première et, dans 3 fermes, 85 bovidés ont été malades pour la troisième fois de huit à douze mois après la seconde atteinte.

« D'autre part, dans 70 exploitations où la maladie s'est manifestée pour la seconde fois, 3.800 bovidés, qui avaient été atteints de un à dix-neuf mois auparavant, sont restés indemnes ainsi que 522 bovidés répartis dans 7 exploitations dans lesquelles la fièvre aphteuse était constatée pour la troisième fois de deux à onze mois après la précédente apparition » (1).

De l'ensemble de ses statistiques, Rudovsky conclut qu'après une première atteinte de la maladie, 81 p. 100 des animaux bénéficient de la « probabilité de l'existence de l'immunité ».

En ces dernières années, soit qu'elles se fassent plus fréquentes, soit qu'on en tienne plus largement compte, les récidives de la fièvre aphteuse retiennent toute l'attention des observateurs. Sur leurs causes, les hypothèses les plus diverses sont émises.

Tout d'abord, Terni (2) admet que les « réinfections sont provoquées par un virus qui présente des caractères infectants différents de celui de l'épizootie en cours... ». Bartolucci (3), qui les considère comme rares, les attribue, entre autres causes, à une « exaltation probable du virus primitif ».

Mettam (4), en 1914, apporte une opinion très précise et d'un haut intérêt. « La virulence de l'agent causal de la fièvre aphteuse, écrit-il, apparaît variable et d'une variation considérable. Il est probable que l'immunité, à l'égard d'un virus ordinaire, faillira facilement devant un virus plus virulent. Il semble qu'il y a lieu de croire que la virulence du virus aphteux est variable comme celle de la peste du cheval et

(1) RUDOVSKY. Rapport au X^e Congrès international de Médecine vétérinaire, Londres, 2, 1914, p. 155.

(2) TERNI. *La Clinica veterinaria*, n° 45, 13 avril 1907.

(3) BARTOLUCCI. *Revue vétérinaire*, 1910, p. 595.

(4) METTAM, Foot and Mouth Disease. X^e Congrès international de Médecine vétérinaire, 2, 1914, p. 418.

aussi celle de la peste du porc dues également à des virus filtrables. »

Moussu (1) rapportant, lui aussi, en 1920 quelques exemples de récidives, écrit à leur sujet : « Il est peut-être possible, en somme, que ce soit une question de qualité et de quantité de virus. »

Mais dès 1914, Terni place la question sur un tout autre terrain (2). « On peut supposer, écrit-il, que la fièvre aphthuse soit vraiment une maladie à type anaphylactique comme plusieurs savants et praticiens inclinent aujourd'hui à le croire pour se tirer d'embarras. » C'est une opinion analogue que Lignières exprime, en la développant longuement, dans son rapport au Congrès pour l'étude de la fièvre aphthuse, tenu à Buenos Aires en 1920 (3). Il résume ainsi son impression : « Lorsque les animaux, après avoir subi une première atteinte, restent constamment dans un foyer infecté, leur immunité peut être perturbée et surmontée et alors on voit réapparaître plusieurs fois la maladie dans un laps de temps relativement court. Les récidives qu'on constate dans la même année sur le même troupeau ne sont donc pas uniquement la résultante d'une immunité débile laissée par une première atteinte, mais elles semblent plutôt la résultante d'une perturbation dans l'établissement normal de cette immunité par des infections répétées à courts intervalles. »

Devant le flottement des doctrines, nous nous sommes proposé de reprendre une étude systématique de l'immunité dans la fièvre aphthuse en recherchant la part qui, dans les variations constatées, revient soit au virus, soit au terrain.

1. — Variabilité du virus aphteux.

Depuis 1920, nous utilisons dans nos recherches un virus originaire d'une épidémie de forme régulière, classique, recueilli par notre élève M. Quentin, dans le département de

(1) MOUSSU. *Recueil de Médecine vétérinaire*, 1920, p. 196.

(2) TERNI. *Bulletin de la Société de Pathologie comparée*, 10 mars 1914.

(3) LIGNIÈRES. *Revue de Pathologie comparée*, n° 79, 20 mars 1921.

l'Oise. Nous désignons ce virus par la lettre O qui, pour nous, rappelle son origine.

A côté de divers virus que nous avons pu rattacher tous à ce type O, figure dans notre collection un virus d'origine allemande dénommé A. Provenant d'animaux de restitution, importés malades de la Prusse orientale, il nous fut adressé par M. Vignardou, alors directeur des Services vétérinaires des Ardennes, qui savait notre ardent désir de disposer d'un virus d'une provenance *aussi éloignée que possible des foyers épizootiques français du moment*. C'est ainsi que nous avons pu poursuivre l'étude comparative des deux virus O et A, d'origines distinctes.

a) *Valeur pathogène des virus O et A.*

Qu'il s'agisse du virus O ou du virus A, l'incubation de la maladie provoquée chez un bovin sensible par inoculation sous-cutanée de 5 cent. cubes de sang virulent varie de deux à sept jours.

En quelques cas, il nous était, tout d'abord, apparu que la durée d'incubation était plus brève pour le virus A que pour le virus O. Cette impression devait s'effacer au cours de plusieurs années de recherches, devant un très grand nombre de constatations. Les mêmes variations s'observent dans la durée de l'incubation de l'infection provoquée par l'un ou l'autre virus. Elles sont évidemment liées bien plus à des conditions individuelles de sensibilité ou aux modalités de la résorption de l'antigène, qu'à une qualité propre du virus. Dans un mémoire ultérieur, nous reviendrons sur toutes ces particularités. Notons simplement ici que nos deux virus O et A ne se distinguent en rien du point de vue de la durée de l'incubation.

De même, l'évolution des infections qu'ils provoquent chez les bovidés demeure d'une gravité et d'une forme comparables. Selon la voie d'introduction du virus et d'autres conditions sur lesquelles nous reviendrons plus tard, le type de la maladie provoquée varie quelque peu. Les mêmes modalités s'observent, pour les mêmes raisons, avec les deux virus. Le veau succombe indifféremment et d'une manière univoque à l'un ou à l'autre.

La sensibilité du porc et du porcelet est égale aux deux virus O et A. Chez les jeunes sujets, de races fines, l'inoculation intramusculaire de 5 cent. cubes de sang virulent provoque l'évolution d'une myocardite, avec œdème pulmonaire aigu et mort rapide. Chez des sujets de races rustiques, ou chez des animaux plus âgés, l'évolution n'est point régulièrement mortelle ; elle se limite aux phénomènes généraux et aux accidents éruptifs accoutumés (4).

Le mouton est également sensible à l'inoculation intramusculaire de 5 cent. cubes de sang virulent des deux types A ou O. Dans un délai moyen de trois jours, l'hyperthermie apparaît très vive chez cette espèce, suivie de sorties éruptives le plus souvent discrètes (2).

Par contre, le cheval est totalement réfractaire à l'inoculation intraveineuse sous-cutanée de 100 ou 200 cent. cubes de sangs virulents O ou A comme à celle de 0 c. c. 25 à 0 c. c. 50 de lymphé aphteuse.

Pour les deux virus, les mêmes particularités peuvent être relevées en ce qui regarde la précocité du pouvoir contagifère du malade dès l'apparition des premières manifestations thermiques, la virulence du sang, du lait et des urines, l'épuration rapide de la salive, etc. Rien non plus de ces points de vue ne permet de distinguer entre O et A.

Sans qu'on en puisse tirer un élément de différenciation, les virus O et A se comportent différemment à l'égard du froid. Tandis qu'un sang virulent O défibriné mécaniquement, inclus en ampoules scellées, conserve son activité au frigorifique entre -1° et $+2^{\circ}$, durant deux, trois et même six mois, un virus A perd en ces conditions beaucoup plus vite toute activité. Seules des températures voisines de -10° ou inférieures même à ce chiffre assurent à ce dernier une longue survie.

(1) Ayant eu le soin de choisir nos porcelets d'étude, dans des élevages depuis longtemps indemnes de fièvre aphteuse dégagés par conséquent de toute immunité ancestrale ou individuellement acquise, nous n'avons point rencontré de sujets réfractaires. Nous estimons donc que les variations de la morbidité aphteuse chez le porc, au cours de certaines épizooties, ne procèdent pas exclusivement, comme on l'a dit, de la qualité du virus qui interviennent.

(2) L'origine des sujets n'importe pas moins ici que chez le porc. Dûment choisi, le mouton représente un réactif économique et précieux pour certaines études sur la fièvre aphteuse.

Il n'apparaît donc point qu'aucune distinction mérite d'être établie entre nos virus O et A (1).

Considérés *individuellement* — sans actions croisées — les virus O et A sont également aptes à provoquer, après *évolution* de l'infection, un solide état d'immunité aphteuse chez le bœuf, le mouton et le porc.

Nous avons constaté et indiqué, il y a fort longtemps déjà, qu'aussitôt survenue la guérison de la fièvre aphteuse, l'immunité est à ce point complète que le sujet convalescent peut recevoir, sans inconvenient sous la peau, à des doses aussi élevées que possible, lymphes, exsudats virulents ou produits de trituration des aphtes. Des doses massives de sang virulent (Moussu), ainsi qu'il était aisè de le prévoir, sont tout aussi bien tolérées, la teneur du sang en virus étant insignifiante au regard de celle des lymphes et des broyages épithéliaux.

Mais si la récidive n'est point obtenue, la réinoculation de 200 à 400 cent. cubes de sang virulent est fréquemment, mais non infailliblement, suivie de réactions thermiques immédiates dont voici quelques exemples :

Génisse n° 153 guérie de virus O,
réinoculée avec ce même virus au trente-troisième jour
(200 cent. cubes de sang virulent) in veine.

Deux heures avant la réinoculation	38,6
A la réinoculation	38,8
Deuxième heure	39
Cinquième heure	40
Huitième heure.	39,6
Vingt-quatrième heure	38,8

Génisse n° 154.
Mêmes conditions que 153.

Deux heures avant l'inoculation	38,7
A la réinoculation	38,6
Deuxième heure	38,6
Cinquième heure	40,4
Huitième heure.	40,9
Vingt-quatrième heure	39,4

(1) Notre regretté collaborateur Virgil Sachelarie, de Bucarest, a vainement poursuivi des essais de différenciation de nos deux virus par la méthode de fixation de l'alexine (technique de Calmette et Massol). Après lui, très aimé

Génisse n° 155.

Mêmes conditions que 153 et 154, mais réinoculation sous-cutanée.

Deux heures avant la réinoculation	38,8
A la réinoculation	38,8
Sixième heure	41,1
Huitième heure	41,2
Dixième heure	39,7

Nous avons pris soin de nous assurer que tous les animaux qui réagissaient de la sorte n'étaient point tuberculeux et que les sangs infectants de réinoculation utilisés provenaient de sujets également indemnes. Il va sans dire que nous avons constaté que semblables réactions ne surviennent pas chez les sujets immunisés réinjectés au sang normal.

Il apparaît donc bien que ces réactions sont liées à l'état allergique des sujets qui les fournissent (1). Cependant, des épreuves intra-dermiques effectuées avec des sérums virulents O chez 25 bovidés vaccinés contre ce virus n'ont donné, que chez 8 sujets seulement, une ébauche de réaction à la vingt-quatrième heure.

La réinfection n'est obtenue, en aucun cas (2), *à court terme*, quelle que soit la forme choisie de la réinoculation ou la dose de virus mise en œuvre, sous cette seule réserve que le virus de réinoculation utilisé sera *celui-là même qui a déterminé l'état d'immunité*.

Tous les faits qui viennent d'être rapportés s'observent également bien qu'on s'adresse soit à des individus guéris d'une infection par notre virus O, soit à des sujets guéris d'une fièvre aphteuse provoquée par notre virus A. Les mêmes constatations peuvent être faites chez le mouton et le porc guéris dans les mêmes conditions, mais toujours sous

lement, M. Boquet d'abord, M. Urbain ensuite, ont bien voulu, à notre demande, entreprendre les mêmes tentatives. Il n'est apparu ni à nos collaborateurs, ni à nous-mêmes que les résultats enregistrés permettent une conclusion sûre.

(1) Nous examinerons dans un mémoire ultérieur, le cas des réactions thermiques enregistrées à la suite d'inoculations intra-veineuses de sang virulent total ou d'hématies virulentes larvées chez des sujets considérés comme sensibles.

(2) Sauf deux exceptions qui seront rapportées un peu plus loin.

cette réserve *formelle*, déjà exprimée, que l'immunité sera toujours recherchée par épreuve directe au virus même qui l'a conférée.

Bref, sous quelque jour qu'on les considère, les virus O et A apparaissent identiques. Rien ne les distingue d'aucun point de vue. Ce sont authentiquement des virus aphéutiques et si nous n'avions pu relever les faits qui vont être exposés, rien ne nous aurait autorisé, en dépit de leurs origines différentes, à en faire deux types distincts. C'est sous une même estampille que nous les eussions classés et c'est indifféremment que nous aurions été tentés de les utiliser, l'un ou l'autre, dans nos recherches (1).

Or, l'immunité totale que confère l'évolution d'une fièvre aphéuse soit à virus O, soit à virus A, contre une récidive par le virus *d'infection première* cède aussitôt si l'on éprouve les sujets qui en bénéficient par un virus distinct. En un mot, les immunités O et A ne « se croisent pas » et ce résultat est tout aussi bien obtenu chez le cobaye, le porc ou le mouton que chez le bœuf même. Nous avons fait connaître cette particularité en deux notes successives présentées à l'Académie des Sciences les 16 janvier et 16 juin 1922. Depuis, nous avons eu la satisfaction de voir confirmer nos recherches en France, tout d'abord par notre collègue et ami, le Dr Lebailly (2), en Angleterre par Sir Stewart Stockman et Minett, Davies et Watt, du *Laboratoire d'études du Ministère de l'Agriculture* (3), par MM. Bedson, Maitland et Burbury du *Lister Institute* (4), aux États-Unis par MM. Olitsky, Traum et Schoening (5), en Allemagne, par

(1) Rappelons ici l'intéressante « hypothèse de travail » de notre regretté ami Schein qui, s'inspirant des variations du type morbide dans les différentes épidémies de l'Indochine, émet l'idée de la possibilité de l'existence de *deux infections distinctes confondues sous le même vocable*. Si nos constatations expérimentales ne nous permettent point jusqu'ici d'apporter une confirmation aux vues de notre collègue, nous tenons à faire observer qu'elles ne les infirment pas (*C. R. de l'Académie des Sciences*, 1922, **174**, p. 204).

(2) LEBAILLY. *Rapport à l'Institut des Recherches agronomiques*.

(3) SIR STEWART STOCKMAN and MINETT, Exper. of Foot and Mouth Disease. *Journ. of Comp. Pathol. and Therapeut.*, 1926, p. 231.

(4) BEDSON, MAITLAND and BURBURY. In *Second Progress Report of the F. and M. Disease Research Committee*, 1927.

(5) Peter K. OLITSKY, Summa of Observ. of the Commission to Study F. and M. Disease. *Journ. of amer. Vet. Med. Association*, **70**, p. 926.

MM. Waldmann et Trautwein (1), en Suède enfin par MM. Magnusson et Hermansson (2).

Nos expériences sur la pluralité du virus aphteux, non interrompues par nos premières communications, portent aujourd'hui sur un total de 173 bovidés. A l'appui de chacun des faits dont traite le présent mémoire, nous nous bornerons à rapporter un ou plusieurs exemples choisis dans l'ensemble de nos résultats.

b) *L'immunité contre le virus O n'est point valable contre le virus A.*

a) La génisse 283 est hémovaccinée activement (3) à l'aide du virus O. On l'éprouve à deux reprises treize mois plus tard avec ce même virus O. Elle se montre totalement réfractaire. Inoculée le quatorzième mois dans les muscles fessiers avec 10 cent. cubes de sang virus A, elle s'infecte, après trois jours d'incubation, de façon sévère.

b) Les génisses 222 et 290, guéries d'une fièvre aphteuse provoquée par le virus O, sont éprouvées sans succès, vingt-trois et trente jours plus tard, par inoculation intramusculaire de 10 cent. cubes de sang virulent O. Quinze jours après cette épreuve infructueuse, on leur inocule, sous la peau, 10 cent. cubes de sang virulent A. Toutes deux s'infectent.

En diverses autres expériences, un total de 52 sujets différents guéris de O se réinfectent dans des conditions entièrement analogues à celles qui viennent d'être rapportées, avec des doses de sang virulent A variant de 5 à 20 cent. cubes inoculées, soit sous la peau, soit dans la veine jugulaire, soit dans les muscles.

On peut prétendre — mais qui l'affirmerait méconnaîtrait le véritable caractère de l'immunité anti-aphteuse d'acquisition récente — que nos épreuves croisées comportaient l'inoculation de trop fortes doses de virus. Voici donc deux expériences qui montrent que la réinfection croisée s'obtient aussi bien avec de très petites quantités de virus, ou par contagion naturelle, que tout autrement.

c) Les génisses 233 et 235, guéries d'une maladie due au virus O, sont vainement éprouvées, le 6 mai 1922, par inoculations intramusculaires, de 10 cent.

(1) WALDMANN et TRAUTWEIN. *Berliner tierärztliche Wochenschrift*, 1926, p. 569.

(2) H. MAGNUSSON et K. A. HERMANSSON. *Acta pathol. et microbiol. Scandinavica*, 1926, 3, p. 737.

(3) Voir notre note à l'*Académie des Sciences*, 6 juin 1921.

cubes de sang de ce même virus. Dix-huit jours après cette épreuve, on leur inocule, dans le derme de la muqueuse labiale, 0 c. c. 20 de sérum virulent A. Toutes deux se réinfectent très sévèrement.

d) En une étable d'isolement vivent en commun les génisses 202 et 204, hémovaccinées activement contre O, puis reconnues réfractaires à ce virus. On introduit parmi elles la génisse 207, guérie d'une infection à virus A depuis quatorze jours et bien à tort considérée comme inoffensive. Survient, au cinquième jour, la réinfection des génisses 202 et 204, tandis que mélangées à elles, les génisses 203, 206, 208, 210, 211, réfractaires aux virus O et A, demeurent indemnes.

c) L'immunité contre le virus A n'est point valable contre le virus O.

Sur 55 bovidés guéris d'une fièvre aphteuse provoquée par le virus A, nous avons pu, en diverses expériences, obtenir à l'aide du virus O, des résultats totalement comparables à ceux qui viennent d'être indiqués. Voici donc un seul exemple de ces faits :

Les génisses 212 et 213, guéries depuis cinquante-huit jours d'une infection provoquée par le virus A, sont vainement éprouvées par ce même virus. Inoculées quinze jours plus tard, sous la peau, avec 10 cent. cubes sang virulent O, toutes deux s'infectent sévèrement.

Les délais dans lesquels nous avons obtenu la récidive par infection croisée, oscillent entre vingt-trois et quatre cent treize jours. Il ne nous a point paru, pour la clarté des observations, qu'il fût utile de tenter d'obtenir des récidives à très court terme. D'ailleurs, chez nombre de nos sujets, la récidive par infection croisée a été obtenue *quinze jours seulement* après l'épreuve destinée à contrôler la valeur de l'immunité primitivement conférée.

Les divers délais de récidive par nous enregistrés sont de vingt-trois, trente-quatre, trente-cinq, trente-six, trente-huit, quarante et un, quarante-neuf, cinquante deux, soixante, quatre-vingt-quatre, quatre-vingt-cinq, quatre-vingt-six, trois cent quinze, quatre cent treize jours.

Dans nos premières séries d'expériences sur l'objet qui nous occupe, nous avions noté de très nets écarts entre les durées de l'incubation lors d'infection initiale et dans le cas de récidive par infection croisée. La suite de nos constatations a totalement

modifié nos moyennes et il ne nous apparaît point que l'incubation, en cas de récidive, soit *toujours* plus brève qu'au cours de l'infection première, ainsi que nous l'avions noté dans nombre de nos premières tentatives.

Les récidives ne sont nullement commandées par une sensibilité propre à l'espèce bovine. On les observe, et dans les mêmes conditions, chez les autres espèces sensibles à la fièvre aphteuse. Vaccinés par une infection première contre les virus O ou A, le porc, le mouton, le cobaye contractent une nouvelle infection à l'occasion d'une épreuve croisée.

Il arrive, cependant, qu'on rencontre des animaux de l'espèce bovine qui, guéris d'une infection O, se montrent réfractaires à une infection A, et réciproquement, des sujets qui, guéris d'une infection A, sont réfractaires à O. Ces faits sont relativement rares. Ils s'expliquent, selon nous, par l'emploi, dans les expériences, de bovidés naturellement réfractaires à tel ou tel type virulent encore que choisis dans des effectifs considérés, bien à tort, comme constitués par des animaux régulièrement sensibles. Sur un total de 473 bovins utilisés dans nos expériences diverses sur les virus O et A, nous avons rencontré 6 animaux réfractaires au second de ces types ; 4 de ces sujets étaient en même temps réfractaires aux deux variétés virulentes.

d) *Immunité cumulative contre O et A.*

Peut-on admettre que les récidives par nous constatées sont imputables à une insuffisance de l'immunité conférée par une vaccination initiale ? Nous ne le pensons pas. On remarquera, en effet, que, chez la plupart de nos animaux d'expérience, la résistance acquise était le fait, non point d'une tentative d'immunisation, mais bien le résultat d'une *atteinte de la maladie*. Toutes nos réinoculations, avec un nouveau virus, furent d'ailleurs précédées d'une inoculation d'épreuve à l'aide du virus de primo-infection.

L'expérience suivante établit, en outre, que l'hyperimmunisation contre l'un des deux virus ne vaccine nullement contre l'autre.

Les deux génisses bretonnes n° 336 et 337, guéries d'une première atteinte de fièvre aphteuse provoquée par notre virus O, font l'objet de cinq inoculations intraveineuses successives de sérums virulents O, pratiquées de semaine en semaine, à des doses variant de 300 à 500 cent. cubes. Elles se montrent indifférentes à ces diverses interventions.

Vingt et un jours après la fin de son hyperimmunisation, la génisse 336 est placée au contact d'une vache en pleine évolution virulente A. Elle s'infecte sévèrement.

Vingt-deux jours après l'achèvement de son hyperimmunisation, la génisse 337 est inoculée dans le derme du pli sous-caudal avec 0 c.c. 25 de sang virulent A. Elle contracte une fièvre aphteuse grave après une incubation de quatre jours.

Seule l'inoculation successive des *deux virus O et A*, alors qu'elle provoque l'éclosion d'une infection régulière, confère une complète immunité à l'égard de O et de A tout à la fois.

Le fait est à ce point évident que nous nous bornons à préciser ici que, sans exception, les cent quinze bovins traités de la sorte, au cours de diverses expériences, se sont montrés immunisés indifféremment contre les deux virus.

e) *Infections simultanées O et A.*

Les précisions ci-dessus exposées étant acquises, l'on peut admettre qu'il est possible de provoquer, chez un même sujet, par une inoculation mixte, des deux virus O et A, une infection simultanée par l'une et l'autre des deux variétés du virus aphteux.

Vingt génisses ont été utilisées, en six expériences, pour cette série de recherches ; nous avons opéré de la manière suivante :

Un bovidé neuf, supposé réceptif, est inoculé, soit sous la peau, avec 20 cent. cubes, soit dans le derme, avec 1 cent. cube, d'un mélange à volumes égaux de sangs ou de sérums virulents O et A. Des relevés thermométriques serrés sont effectués. A chaque poussée fébrile, on récolte du sang qui, défibriné, est aussitôt inoculé sous la peau à un bovin reconnu réfractaire à O et à un bovin reconnu réfractaire à A. En outre, sont exposés à la contagion auprès de l'animal en expérience, un bovin reconnu réfractaire à O et un bovin reconnu réfractaire à A. Tel ou tel de ces sujets venant à s'infecter, permettra d'établir la nature du virus en cause. Les résultats de cette double épreuve doivent être concordants.

Opérant en ces conditions sur quatre génisses sensibles, n°s 374, 375, 376, 377, nous avons obtenu, chez chacune d'elles, une *évolution cumulative* des deux virus, évolution démontrée tout à la fois par les réactions des animaux réfractaires éprouvés par cohabitation, par l'inoculation du sang des saignées et au surplus par des épreuves aux virus O et A des quatre sujets soumis à la double infection. L'infection cumulative s'est traduite chez 374, 375, 376, par deux éruptions bucales successives à quarante-huit heures d'intervalle. Par contre, chez 377, il n'est apparu qu'une seule éruption.

Dans une autre expérience, quatre génisses n°s 240, 251, 252, 285, inoculées avec un mélange à volumes égaux de sérum O et A, préalablement reconnus indépendamment virulents, s'infectent. On ne peut mettre en évidence chez elles qu'une infection par le seul virus O. Mais les quatre génisses réinoculées un mois plus tard, en même temps qu'un témoin, avec un virus A, se montrent réfractaires.

Quatre autres expériences aboutirent à des résultats comparables à ceux des tentatives ci-dessus rapportées. Au total, sur 20 animaux soumis à des épreuves simultanées d'infection par nos virus O et A, 8 ont vu évoluer en même temps ces deux virus, 7 n'ont contracté qu'une infection O, et 5 qu'une infection A. Dans tous les cas, nous avons enregistré, en fin d'expérience, une solide immunité bivalente des animaux qui en ont fait l'objet.

De même qu'il est expérimentalement possible de provoquer chez un sujet sensible aux deux types de virus O et A une *évolution simultanée* de ces formes virulentes, l'on peut obtenir une *vaccination bivalente* contre elles. Déjà, en collaboration avec Rinjard, nous avons fait connaître cette particularité et réalisé une immunisation satisfaisante contre la fièvre aphthuse, à la faveur de virus tués par des procédés appropriés (1).

De tous les faits ci-dessus exposés, nous ne pouvons que conclure à la dualité démontrée des virus aphteux O et A, notion

(1) VALLÉE, CARRÉ et RINJARD. *Bulletin de la Société centrale de Médecine vétérinaire*, 16 juillet 1925, et *Revue générale de Médecine vétérinaire*, 1926, p. 429.

qui emporte avec elle celle de la pluralité des agents pathogènes de ce type (1).

Il nous paraît inutile d'insister sur la portée d'une telle constatation qui appelle, avec la réforme de notions tenues pour classiques, une revision expérimentale de bien des faits considérés comme acquis, une orientation nouvelle des tentatives d'immunisation et des mesures sanitaires internationales.

f) *Repartition des divers virus dans la nature.*

Grâce à l'aimable obligeance de MM. Vignardou, Forgeot, Richart, Monsarrat, Vélat, Guichard, Ducloux, Savance, Gardas, directeurs des services vétérinaires des départements, et au concours empressé de nos confrères Quentin, de l'Oise; Perrier, de Gex; Poirier, du Cher; Carel, des Hautes-Alpes; Roy, du Loiret; Giboin, des Pyrénées-Orientales, nous avons reçu de divers points de France des échantillons de multiples origines de virus aphteux et nous avons pu les identifier expérimentalement. Mais aussi des échanges de virus ont eu cours entre notre laboratoire et ceux de nos collègues les Drs Lebailly, de Caen; Sir Stewart Stockman, de Londres; les professeurs de Blieck et de Jong, d'Utrecht; et M. Schmidt-Jensen, de Copenhague.

Nous avons pu, de la sorte, identifier 20 souches de virus. Toutes se rapportent à nos types O ou A. Des deux formes étudiées par nous, la plus fréquemment retrouvée est la forme O : 16 échantillons sur 20 examinés, contre 3 seulement appartenant à la forme A.

Nos collègues du *Comité anglais de Recherches sur la fièvre aphteuse* ont étudié de leur côté 17 souches de virus d'origine britannique en les comparant à nos virus O et A. Une seule répondait au type A, les 16 autres appartenaient au type O (2).

(1) Parmi tous les chercheurs qui ont contrôlé nos premières communications relatives à la pluralité des virus aphteux, MM. Ernst, W. F. Guth et Hopfengärtner (*Münch. Tierärztl. Wochenschrift*, 1927, p. 433) sont seuls à en discuter les conclusions. Après lecture du présent mémoire, on comprendra que nous ne puissions souscrire aux vues de nos distingués contradicteurs qui, n'ayant point eu, comme nous, la facilité d'expérimenter sur les bovidés, concluent d'après leurs seules recherches sur le cobaye.

(2) *Second Progress Report of the Foot and Mouth Disease Research Committee.* Ministry of Agricul., London, Stationery Office, 1926.

MM. Waldmann et Trautwein (1), nos collègues de l'île de Riems, ont éprouvé 76 origines distinctes de virus. Ils ont pu les classer sous trois types qu'ils dénomment A, B, C. Leur type A correspond à notre forme O et leur groupe B à notre type A (2). En rapportant leur nomenclature à la nôtre, on constate qu'elle porte sur 48 échantillons identifiables à O et 9, seulement, identifiables à A. 19 virus qui n'ont pu être assimilés à l'un des types précédents relèvent, pour nos collègues allemands d'un type nouveau C qu'ils sont seuls, jusqu'ici, à avoir identifié.

L'ensemble de nos constatations et des faits observés à l'étranger démontre en somme que *les virus du type O sont de tous les plus répandus* (81 échantillons sur 113), le type A étant moins fréquemment identifié (13 échantillons).

On ne pouvait douter, au surplus, que les virus O et A fussent indistinctement répandus sur divers territoires. Il se rencontre, en effet, parfois, parmi les bovidés acquis dans un but expérimental et dans différentes régions, des sujets spontanément réfractaires à l'inoculation de l'un ou de l'autre types virulents. De même, dans les divers foyers d'où provenaient nos virus d'études, se rencontraient toujours quelques sujets réfractaires à la contagion naturelle. L'immunité ainsi observée doit être rattachée, dans la plupart des cas, à l'évolution antérieure d'une fièvre aphthée provoquée par un virus du même type que celui utilisé pour l'expérience, ou rencontré dans l'épidémie en cours.

Nous estimons donc que les virus O et A sont dispersés en diverses régions de France et de l'étranger. Rien, d'aucun point de vue, ne distingue les foyers qu'ils provoquent (facilité d'extension, malignité, espèces atteintes ...) pas plus qu'aucune qualité propre ne les caractérise qui puisse être mise expérimentalement en évidence, hormis leur valeur immunisante, strictement monovalente.

(1) K. TRAUTWEIN, Die Pluralität des Maul und Klauenseuche. *Archiv. für Wissenschaft. und prakt. Tierheilkunde*, 56, 1927, p. 505 (avec bibliographie des travaux antérieurs de Waldmann et de ses collaborateurs).

(2) De concert avec le professeur Waldmann, nous avons obtenu de l'*Office international des Epizooties* qu'un accord intervienne sur les dénominations à attribuer aux types actuellement classés du virus aphthé. Sont retenues les appellations O et A (Vallée et Carré) et C (Waldmann).

II. — De la valeur de l'immunité monovalente acquise ou conférée.

A la lumière des faits qui viennent d'être exposés, le plus grand nombre des documents offerts pour l'appréciation de la durée de l'immunité consécutive à une première atteinte de fièvre aphteuse, demeure sans valeur. On ignorait, en effet, trop souvent jusqu'ici, si telle récidive constatée sur un troupeau relevait bien du virus responsable de l'infection première ou de tout autre.

En l'absence de toute précision sur la nature ou l'origine des virus utilisés, nombre de faits expérimentaux relatifs au même problème n'offrent guère plus d'intérêt que les données de l'observation pratique.

Nous estimons donc opportun de rapporter ici des faits précis sur un tel objet.

Ainsi que nous l'avons indiqué, en diverses circonstances, toutes nos expériences relatives à la fièvre aphteuse ont été poursuivies, depuis 1920, à l'aide de virus soigneusement entretenus et identifiés. Nous avons, d'autre part, l'heureuse fortune de disposer d'un laboratoire aménagé de telle manière que nous n'avons point à redouter d'incidents expérimentaux. Grâce enfin à une installation frigorifique irréprochable, nous jouissons de la facilité de conserver aisément nos virus et de n'expérimenter jamais que sur un seul d'entre eux à la fois et durant toute la période nécessaire à une sûre interprétation des faits. Aucune substitution virulente, aucun accident de contamination n'ont pu survenir et nous avons cette certitude que les résultats ci-après rapportés ne sont en rien contestables.

a) *L'immunité consécutive à une première atteinte de la maladie est complète si on éprouve sa valeur dans un bref délai après l'infection.*

On sait que divers auteurs considèrent comme toute relative l'immunité conférée par une première atteinte de la maladie. Nos constatations ne nous autorisent point à partager leur opinion. A court terme, dans les quelques semaines qui suivent

l'infection, et d'ordinaire beaucoup plus tard, nous avons régulièrement relevé chez tous nos bovidés d'expérience un état absolu d'immunité, insurmontable par tous moyens.

Il y a plus de vingt ans déjà que, rapportant des tentatives d'obtention d'un sérum anti-aphteux, nous avons indiqué qu'aussitôt guéris d'une infection, même bénigne, les bovins supportent d'emblée soit par la voie veineuse, soit par les voies sous-cutanées ou intramusculaires, des doses massives de virus. Les expériences suivantes, choisies parmi tant d'autres, l'établissent sans contestation possible.

I. — Vingt-quatre jours après une première atteinte de fièvre aphteuse du type O, deux génisses sont inoculées avec toutes les précautions requises dans la veine jugulaire et par moitié chacune, avec le produit du broyage de 5 grammes de lambeaux d'aphtes recueillis deux heures auparavant chez des bovidés en pleine éruption vésiculeuse (même type virulent). Grâce aux précautions prises, aucun incident immédiat n'est enregistré; trois heures après l'inoculation, la température atteint 40°2 chez l'un des sujets et 40°8 chez l'autre. *Aucune manifestation aphteuse* ne survient dans la suite.

II. — En diverses expériences, vingt-cinq bovins guéris les uns d'une première infection à virus O, les autres d'une infection à virus A, depuis quinze à trois cents jours, reçoivent sous la peau ou dans les muscles des doses de 50 à 200 cent. cubes de sangs virulents du type correspondant à leur état d'immunité. Aucun de ces sujets ne se réinfecte.

III. — L'inoculation intra-cérébrale elle-même est impuissante à vaincre la résistance conférée. L'expérience suivante en témoigne :

Deux veaux (n° 167, né d'une mère immunisée au virus O durant la fin même de sa gestation, et 202, hémovacciné activement avec ce même virus) sont inoculés, en pleine masse cérébrale, chacun avec 1 cent. cube d'un sérum O virulent et reconnu tel chez plusieurs bovins témoins. On n'enregistre aucun trouble immédiat, ni aucun phénomène éloigné.

Ces faits régulièrement observés dans nos expériences nous apparaissent constants. Ni les quantités de virus, ni les voies d'introduction utilisées, pas plus que la virulence du virus de contrôle choisi, ne semblent intervenir (1). Bref, l'immunité conférée par une première atteinte est de règle, rien ne la surmonte, et cette règle s'applique aux cas de nos deux virus O et A (2).

(1) Observons en passant combien est aléatoire l'appréciation de la virulence en l'espèce qui nous occupe. Tel virus issu d'un foyer épizootique sévère ou d'une forme mortelle de la maladie se révélera médiocre expérimentalement, tandis qu'un virus jugé, d'après les faits, fort peu actif, apparaîtra au laboratoire d'une exceptionnelle sévérité.

(2) Précisons une fois de plus que toutes nos expériences ont pu être pour-

Très généralement aussi, la résistance acquise est rapidement obtenue. Nous nous bornons à signaler ce fait ici, nous réservant d'en discuter plus longuement d'autre part.

III. — Durée de l'immunité acquise.

Il n'est point douteux qu'en cette matière, comme en tant d'autres, l'élément individuel joue un rôle qui n'est point négligeable.

A l'égard du virus O, que nous avons plus longuement étudié que tout autre, l'immunité conférée par une *évolution régulière* de l'infection n'est pas inférieure en durée, chez les animaux soustraits à toutes causes accidentelles de réinfection, *à une année en moyenne* [deux cent soixante-cinq à quatre cent cinquante jours] (1).

L'immunité conférée par le virus A nous a semblé un peu moins durable. Tandis que nous avons rencontré des animaux guéris d'une première infection à virus O encore réfractaires après vingt-deux mois — terme extrême sur lequel nos constatations aient pu porter — nous n'avons vu, sur un total de 11 sujets guéris d'une infection A, qu'un seul animal résister au delà du quinzième mois à la réinfection par ce même virus.

Le mode d'épreuve utilisé dans ces recherches consistait soit en une inoculation sous-cutanée de 5 ou 10 cent. cubes de sang virulent défibriné, soit en la mise en contact permanent du sujet à éprouver avec un animal infecté.

L'immunité anti-aphtéuse apparaît donc solide et fort appréciable en sa durée; elle s'éteint cependant, à la longue. Dans nos recherches, presque toutes effectuées sur la race bretonne, nous n'avons pas rencontré de bovins âgés de plus de six ans qui soient réfractaires à l'infection expérimentale. La sensibilité, presque régulière, de nos sujets moins âgés (trois-quatre

suivies sur l'espèce bovine et que nous estimons qu'on ne peut en rien conclure pour celle-ci — en la présente matière — d'essais réalisés sur une autre espèce sensible au virus aphtéux, telle le cobaye.

(1) Nous indiquerons, dans de futures publications, que la résistance consécutive à diverses tentatives d'immunisation active varie — toutes conditions étant égales d'autre part — entre assez larges limites selon les individus vaccinés.

ans), dont beaucoup avaient dû cependant payer leur tribut à l'épizootie, permet de conclure que l'immunité consécutive à une première atteinte de la maladie n'excède pas couramment dix-huit mois à deux ans. Mais en quelques rares circonstances, il apparaît que l'immunité conférée par une première atteinte de l'infection puisse être d'une durée exceptionnellement courte. Voici les deux seuls exemples que nous ayons recueillis de ce fait :

a) La génisse 287, après une première infection par virus O, est réinoculée quarante jours plus tard par voie intramusculaire avec 10 cent. cubes d'un sang virulent O. Elle s'infecte régulièrement après une incubation de six jours;

b) La génisse 321 subit une première évolution aphteuse sévère provoquée par notre virus O. Eprouvée trois mois plus tard avec ce même virus, elle se réinfecte gravement (10 cent. cubes sang virulent par voie sous-cutanée).

Rien, dans l'un et l'autre cas, ne permet de préciser les raisons de la défaillance constatée. Notons qu'entre le moment de leur guérison et l'instant de l'épreuve de leur immunité, ces sujets avaient été soigneusement tenus à l'abri de toute contamination.

IV. — Immunité générale et immunité tissulaire.

Aux constatations de Terni (1), à celles surtout de Waldmann et Trautwein et de la Commission royale anglaise, effectuées avec un seul et même virus, nous aurons peu à ajouter (2).

De constatations déjà fort anciennes (3) et d'expériences dont nous avons fait état d'autre part (4), nous avons pu conclure à l'extrême sensibilité du derme cutané ou muqueux au virus aphteux. Des doses de virus tolérées par inoculation intraveineuse ou sous-cutanée se révèlent pathogènes par inoculation intradermique. Aussi avons-nous été conduits à éprouver

(1) TERNI, Etude sur l'immunisation anti-aphteuse. *Bulletin de la Société de Pathologie comparée*, 1914, p. 64.

(2) *Second Progress Rep. of the Foot and Mouth Disease Research Committee*, London, Stationery Office (Minist. of Agricul.), 1926.

(3) ROUX, VALLÉE, CARRÉ et feu NOCARD. *C. R. de l'Académie des Sciences*, 173, 1921, p. 4141.

(4) H. VALLÉE et H. CARRÉ, Sur l'immunité anti-aphteuse. *C. R. de la Société de Biologie*, 90, 1924, p. 177.

comparativement, par des voies différentes, la résistance de bovins considérés comme réfractaires à divers modes d'infection.

Opérant toujours avec un même virus — principalement avec notre virus O —, nous avons constaté des récidives *purement locales* par inoculation dans le derme de la muqueuse labiale, tandis que par comparaison avec des sujets de conditions identiques, la résistance paraissait entière à tous autres modes d'épreuve.

Voici divers exemples expérimentaux qui montrent bien que c'est à juste titre que l'on peut opposer à une *immunité générale un état tout local de sensibilité tissulaire* :

a) Les génisses 219 et 221 sont toutes deux guéries depuis vingt-deux mois d'une infection provoquée par notre virus O. Le même jour, ces deux sujets subissent une épreuve d'immunité avec un sang virulent O. Eprouvée par inoculation intramusculaire de 10 cent. cubes de sang virulent, 219 se montre réfractaire, tandis que 221 inoculée dans le derme labial avec 0 c.c. 25 du même sang se réinfekte.

b) La génisse n° 231, guérie d'une infection O est vainement éprouvée deux cent quatre-vingt-cinq jours plus tard par inoculation sous-cutanée de 10 cent. cubes de sang virulent O. Loin d'avoir consolidé son état d'immunité, cette intervention laisse l'animal entièrement sensible à une inoculation labiale du même virus. Mais la récidive constatée se limite à la formation d'un seul aphte au point d'épreuve, sans qu'on note une éruption secondaire.

c) La génisse 361, guérie depuis six mois d'une infection O, résiste à une épreuve sévère par voie sous-cutanée. Pas plus que dans l'exemple précédent ce sujet ne bénéficie de cette intervention, car il se montre, un mois plus tard, entièrement sensible à une épreuve d'infection par la voie labiale.

V. — Du mécanisme des récidives.

Si l'immunité cède toujours, même à très bref délai, devant un virus nouveau, ainsi que nous l'avons indiqué plus haut, la récidive à *court terme* provoquée par un *même virus* ne peut être qu'exceptionnelle. C'est à la faveur de cette notion qu'il est possible de tenter de délimiter la part qui revient dans les récidives, soit au terrain, soit à l'intervention d'un virus différent de celui de l'infection première.

Ubbels (1), par exemple, note, en ses constatations relatives

(1) UBBELS. *Tijdschrift voor Diergeneeskunde*, 15 février 1920, p. 158 et *Annales de Médecine vétérinaire*, 1920, p. 385.

à la durée de l'immunité, que dans les fermes par lui contrôlées, la récidive est survenue *en moins d'un an à peu près chez tous les animaux* et sous une gravité égale à celle de la première atteinte. Virus initial et virus de récidive différaient ici. La régularité quasi-constante de la réinfection et l'égale sévérité de la récidive semblent l'indiquer indiscutablement.

La même conclusion paraît s'imposer dans l'observation suivante que nous devons à l'amabilité de MM. Monsarrat et Haut-cœur, directeur et directeur-adjoint des Services vétérinaires du Nord :

Le 30 avril 1926, la fièvre aphteuse se déclare sur un lot de 22 bovins. Quinze s'infectent, sept restent indemnes. Le 20 mai, tous les malades sont guéris. Le 24 juin, soit cinquante-cinq jours après la première invasion, nouvelle élosion de la maladie. Cette fois, tous les animaux sont atteints et ceux-là même qui avaient particulièrement souffert de la première atteinte du mal sont aussi gravement affectés que leurs congénères.

D'autre part, nous avons pu rassembler, grâce à la cordiale assistance de tant de nos confrères, de nombreuses observations de récidives de fièvre aphteuse. Mais c'est trop exceptionnellement que nous eûmes à notre disposition les virus en cause dans les récidives et, comme bien l'on pense, nous n'avons jamais eu la bonne fortune de posséder, au préalable, le virus responsable de l'infection première. Tout au moins, dans quelques cas, la variété du virus rencontré dans la région à l'heure de la manifestation initiale de la maladie nous étant connue, nous avons pu identifier un virus différent dans l'épizootie de récidive. De telles constatations, notamment, ont pu être faites dans l'Ain, grâce à l'aimable intervention de nos confrères, MM. Forgeot, directeur des Services vétérinaires et Perrier, de Gex.

Dans tous les cas, il s'agissait de récidives pures et simples, dans des délais variant de un à deux ans et dans des zones où la maladie avait complètement cessé de régner depuis neuf mois au moins. On appréciera plus loin l'intérêt de ces précisions.

En maintes circonstances, les récidives sont constatées sous des formes bien différentes de celles que nous venons d'examiner. Il apparaît, notamment, que dans les observations de Rudovsky, citées au début de ce mémoire, les faits rapportés relèvent de deux facteurs distincts. S'il ne semble pas contes-

table que dans les 70 fermes où l'infection, sévissant pour la seconde fois, épargne 3.800 bovins déjà atteints précédemment, le *même virus* soit toujours intervenu, il est impossible d'admettre qu'une seule et même variété de virus provoque, chez les mêmes sujets, en deux ans, cinq, six et jusqu'à sept évolutions successives. La notion de la pluralité des virus et la connaissance des trois types mis au jour par nous-mêmes et nos collègues allemands, ne suffit pas davantage à éclairer de tels faits. A n'en point douter, des influences individuelles interviennent ici et il convient d'en rechercher l'origine et la nature.

Grâce au précieux concours de notre confrère, M. Poirier, de La Guerche (Cher), nous avons pu connaître deux cas de fréquentes récidives. L'un d'eux concerne un effectif bovin qui fit l'objet, du 6 juin 1923 au 10 janvier 1924, de trois évolutions de fièvre aphteuse. Le virus de la troisième épizootie fut inoculé sans succès, par la voie intradermique, à deux bovins vaccinés contre nos virus O et A. C'est donc que l'une de ces deux variétés était en cause et qu'il ne s'agissait point, dans cette récidive, d'un troisième virus inconnu jusqu'alors.

L'autre observation concerne une autre exploitation qui, de juin à décembre 1923, fit l'objet de *cinq évolutions aphteuses authentiques*. Nous n'avons pu, malheureusement, disposer des virus responsables de chacune d'elles.

Devant de telles constatations, on ne saurait douter de la parfaite *aptitude à la récidive* de la fièvre aphteuse, à la faveur de tel ou tel des virus précédemment identifiés. La connaissance de *trois types* seulement de ceux-ci ne peut à elle seule expliquer l'apparition de *cinq évolutions successives* dans un délai de quelques mois seulement si l'on n'admet point la possibilité des récidives au même virus.

En présence de faits semblables, l'intéressante hypothèse de Terni, sur le « type anaphylactique » de l'infection aphteuse que nous rappelions au début de ce mémoire et celle de Lignières sur la « perturbation apportée dans l'établissement normal de l'immunité par des infections répétées à courts intervalles » reviennent tout naturellement à l'esprit. A l'appui de leurs hypothèses, ni Terni, ni Lignières, n'apportent de faits expérimentaux. Eussent-ils pu le faire que de telles expériences

auraient comporté une inévitable part d'erreur, la notion de la pluralité des types n'étant point assise à ce moment.

Nanti de types de virus solidement homologués et de bovidés entretenus dans des conditions expérimentales complètement sûres, nous avons pu relever certains faits dont la valeur démonstrative nous apparaît irréprochable.

Rappelons, tout d'abord, que l'immunité spécifique conférée contre notre virus O ne peut être surmontée par aucun artifice d'inoculation et que, sauf de rarissimes exceptions, elle n'est point inférieure en durée à un an en moyenne, chez des sujets soustraits à toute cause de réinfection accidentelle.

Il en va tout autrement chez des animaux soumis expérimentalement à des *assauts virulents répétés*, ainsi qu'en témoignent les constatations suivantes :

OBSERVATION I. — Vache bretonne très âgée, poids 257 kilogrammes, n° 255.

Fait tout d'abord l'objet d'une évolution sévère de fièvre aphèteuse expérimentale provoquée par le virus O. Reçoit ensuite, à compter du vingtième jour consécutif à cette première infection, 4 inoculations intraveineuses du produit de broyage de lambeaux d'aphtes tout fraîchement récoltés sur des bovins infectés de virus O, savoir :

Le vingtième jour après l'infection initiale : 12 grammes de lambeaux.

Le vingt-cinquième jour après l'infection initiale : 12 grammes de lambeaux.

Le cinquante-septième jour après l'infection initiale : 5 grammes de lambeaux.

Le soixante-troisième jour après l'infection initiale : 5 grammes de lambeaux.

L'animal abandonné à lui-même est, dans la suite, maintenu à l'abri de toute cause de contamination aphèteuse. Puis on l'introduit six mois plus tard auprès d'une génisse infectée de virus O. Survient alors, chez cet animal qu'on aurait pu croire hyperimmunisé, une récidive grave de la maladie que le contrôle démontre bien être provoquée par le virus O (1).

OBSERVATION II. — La génisse 313 se montre naturellement réfractaire à une première infection par virus O. Elle reçoit ensuite vingt-quatre, trente, trente-huit, soixante-cinq jours plus tard, des inoculations virulentes de lymphes ou de broyages épithéliaux du même type de virus. Cinquante jours après cette dernière intervention, elle s'infecte de virus O par aphtisation buccale. La maladie provoquée est grave.

OBSERVATION III. — La génisse 314 subit tout d'abord une évolution aphèteuse O provoquée. Après guérison, elle fait l'objet d'un traitement iden-

(1) Trente-huit jours plus tard, ce même sujet se réinfectait par le virus A fournissant, de la sorte, en moins de neuf mois, trois évolutions aphèteuses sévères.

tique à celui mis en œuvre chez l'animal de l'observation précédente. Dans la suite et dans les mêmes conditions aussi, elle contracte, comme 313, par aphtisation buccale, une sévère infection.

Les constatations ci-dessus rapportées ont été recueillies dans des conditions expérimentales si sûres et si sévères que nous n'hésitons point à tenir pour acquis ce fait que, chez un bovidé guéri d'une première atteinte de fièvre aphteuse, les réinoculations successives, loin d'aboutir à une hyperimmunisation, conduisent l'organisme — sous certaines conditions qui restent à préciser — à un parfait retour à la réceptivité initiale envers le même type virulent, voire à une véritable sensibilisation.

On ne peut douter qu'à côté des modalités de la réinfection précédemment indiquées, ce dernier facteur joue un rôle dans la fréquence des récidives si couramment observées de l'infection aphteuse, mais il ne nous est point encore possible d'en préciser l'importance.

Une dernière série de recherches nous permettra d'apprécier le rôle respectif des notions de la *pluralité* des virus et de la *sensibilisation des organismes* dans le mécanisme des récidives de l'infection aphteuse. Elle se poursuit actuellement sur les bases suivantes :

Des bovidés guéris d'une première atteinte de la maladie provoquée par un ou plusieurs virus connus, sont divisés en deux lots. L'un, *maintenu à l'abri de toute contamination*, est destiné à des épreuves expérimentales propres à préciser la durée — en ces conditions — de la résistance conférée. L'autre est *systématiquement entretenue en milieu infecté* et toute récidive observée, chez les animaux qui le constituent, fait l'objet d'une identification précise de la variété du virus qui la détermine. De la sorte, nous favorisons à l'extrême l'apparition des récidives, tout en nous plaçant dans des conditions sûres et non encore satisfaites pour une analyse complète de leurs causes.

Si nous rencontrons dans les milieux agricoles ce même concours éclairé qui nous est déjà acquis du côté de nos confrères, nous entendons étudier, expérimentalement, sur quelques séries de nos animaux, l'influence désensibilisante de certaines inoculations bactériennes ou protéïniques sur les

manifestations des récidives aphteuses. L'intérêt est grand, en effet, de cette constatation depuis longtemps faite en Europe et que Lignières renouvelait, en 1920, dans l'Amérique du Sud : la vaccination antibactéridienne, la vaccination contre le charbon symptomatique, paraissent constituer en pleine épidémie aphteuse, des palliatifs dont la valeur est bien loin d'être négligeable.

Résumé et Conclusions.

I. A l'exemple d'autres facteurs de la virulence, le virus aphteux n'est point d'un type unique.

Nous avons pu démontrer l'existence de deux races de virus que nous dénommons O et A, auxquelles MM. Waldmann et Trautwein ont ajouté un troisième type, C. La pluralité des virus aphteux apparaît donc indiscutable.

II. Rien ne permet de distinguer l'un de l'autre les virus O et A, ni les caractères des infections qu'ils provoquent, ni leur valeur pathogène pour les diverses espèces sensibles, ni les modes de leur inoculation. Seules les réactions d'immunité croisée permettent de les identifier. Ils n'ont témoigné d'aucune variation au cours de plus de cinq années d'études.

III. L'immunité contre O reste sans valeur contre A et réciproquement.

IV. Il est possible de provoquer chez un même sujet une infection simultanée, double, par O et A et d'obtenir chez lui une immunité cumulative entre ces deux formes virulentes.

V. La notion de la pluralité des virus aphteux appelle une réforme de nombre de notions considérées comme classiques, une orientation nouvelle des essais d'immunisation et des formules de l'action sanitaire.

VI. Les virus O et A sont répandus en divers pays. Le premier est le plus fréquemment rencontré en France, en Angleterre, en Allemagne.

VII. Pour chacun des virus O et A, l'immunité consécutive à une première infection apparaît complète, si l'on éprouve sa valeur dans un bref délai après l'infection.

VIII. La durée de l'immunité conférée par une atteinte

régulière de la maladie n'est pas inférieure à une année en moyenne. Elle paraît plus longue pour O que pour A. A titre *très exceptionnel*, elle peut ne point excéder quelques semaines seulement.

IX. Il y a lieu d'opposer, chez certains sujets, à un état général d'immunité, un état tout local de sensibilité tissulaire.

X. La notion de la pluralité des virus aphteux ne suffit point à elle seule à expliquer tous les faits de récidive de l'infection naturelle. Sous certaines conditions qui restent à préciser, les réinoculations successives d'un même virus, loin d'aboutir à un état d'hyperimmunité, conduisent l'organisme au retour vers sa sensibilité initiale au même type de virus.

(Institut des Recherches agronomiques. Laboratoire national de Recherches des Services vétérinaires.)

ÉTUDE BACTÉRIOLOGIQUE DES AFFECTIONS TYPHOÏDES DU CHEVAL

par ACH. URBAIN et L. CHAILLOT.

Sous le nom d'« affections typhoïdes » du cheval, on a décrit des maladies épidéziennes, qui présentent comme caractères communs, l'abattement, l'hyperthermie, la couleur capucine des muqueuses, et une grande faiblesse générale. Elles diffèrent entre elles par un certain nombre de particularités, telles que la gravité, la localisation sur les organes, la diversité des complications, etc.

Les « affections typhoïdes » sont dues à un virus filtrable, découvert par Poels (1) en 1909 et bien décrit par divers autres auteurs, en particulier, par Basset (2).

De nombreux travaux ont montré que ce virus filtrable est fréquemment associé à des germes variés : streptocoque, *Pasteurella*, etc. Quelques auteurs croient même que certaines maladies du cheval à allure typhoïde, seraient uniquement sous la dépendance de microbes voisins du groupe des paratyphiques [Carpano (3), Combes (4), Lignières (5), etc.]. Brocq-Rousseau, Forgeot et Ach. Urbain (6), au cours d'épidémies ayant sévi en 1925 sur les chevaux de deux régiments différents ont pu isoler, de divers produits pathologiques, des microbes voisins des paracolibacilles et des paratyphiques.

Les germes isolés dans ces deux épidémies avaient tous un caractère pathogène très marqué vis-à-vis des petits animaux de laboratoire et pour le cheval. Ces microbes avaient été

(1) POELS, Smetstofdragers. *Tidschrift voor Veeartsenijkunde*, 1909, p. 39.

(2) BASSET. *Rec. de Méd. vétér.*, 15 septembre 1911, p. 546; *C. R. Acad. Sciences*, 21 août 1911; *Rec. de Méd. vétér.*, 1912, p. 88.

(3) CARPANO. *Settimana Veterinaria*, 1915; *Clinica Veterinaria*, nos 1 et 2, 1918.

(4) COMBES. *C. R. Soc. Biol.*, 8 décembre 1917, p. 898; 26 janvier 1918, p. 75; 23 mars 1918, p. 208.

(5) R. LIGNIÈRES, Contribution à l'étude et à la classification des *Salmonelloses* humaines et animales. *Thèse méd.*, Paris, 1922.

(6) BROCQ-ROUSSEAU, FORGEOT et ACH. URBAIN. *Rev. génér. de Méd. vétér.*, 15 mai 1924, p. 229.

recueillis immédiatement après la mort ou l'abatage, c'est-à-dire dans les meilleures conditions, pour éliminer les microbes de sortie. D'autre part, le résultat négatif de la transfusion sanguine du cheval malade au cheval sain avait permis d'éliminer l'hypothèse d'un virus filtrable. Aussi, Brocq-Rousseau, Forgeot et Ach. Urbain, ont-ils nettement incriminé ces microbes, comme agents étiologiques des épidémies observées.

Au cours d'épidémies d'« affections typhoïdes » qui ont sévi, d'octobre 1927 à février 1928, sur des chevaux de régiments de l'armée du Rhin, de l'Est et du Nord de la France, ou de la région parisienne, il nous a été permis de faire l'étude bactériologique d'un grand nombre de produits pathologiques prélevés dès la mort des animaux, ou de pratiquer des hémocultures, les premiers jours de la maladie, à la période où la réaction thermique était la plus élevée (40° - $40^{\circ}5$). Nos recherches ont porté sur environ 200 prélèvements : sang du cœur, liquides pleuraux, péricardiques, péritonéaux, moelles osseuses et sur 20 hémocultures.

Voici les résultats globaux que nous avons enregistrés avec les prélèvements :

75 examens ont montré du streptocoque,

9 examens ont décelé des germes Gram négatifs, mobiles,

2 examens ont montré de la *Pasteurella*,

114 examens sont restés négatifs.

Les 20 hémocultures ont fourni une fois du streptocoque, deux fois un germe Gram négatif, mobile.

Nous avons entrepris l'étude bactériologique des 11 germes, Gram négatif, mobiles. Nous allons donner en détails, celle qui se rapporte aux souches isolées des malades du 25^e régiment d'artillerie et du 41^e régiment d'artillerie.

1^e Souche « 25^e d'artillerie ». — Cette souche a été obtenue d'une hémoculture d'un cheval atteint de la forme grippale des « affections typhoïdes ».

CARACTÈRE DU MICROBE. — A l'état frais, ce microbe est mobile. Il est facile à mettre en évidence d'assez nombreux cils. Il ne prend pas le Gram. Coloré au Ziehl, il se présente sous la forme d'un bacille court, en navette, à extrémités plus colorées que le centre. Sa température optimum de culture est de 37° .

CULTURES. — *En bouillon Martin* : quatre à cinq heures après l'ensemencement, apparaît un trouble uniforme; l'agitation montre des ondes moirées; puis, le trouble augmente; après quarante-huit heures, il se forme une petite colllerette à la surface. Il ne se dégage pas d'odeur.

Sur gélose : Les colonies isolées sont blanches, arrondies, assez volumineuses et épaisses.

Sur gélose au sous-acétale de plomb : Ensemencé par piqûre, après vingt-quatre heures, le milieu montre un léger noircissement, accompagné d'un dégagement de gaz. Très rapidement, le noircissement s'accentue en surface et en profondeur.

Sur gélose glucosée, au rouge neutre : Culture rapide, il y a formation de gaz. Le virage commence à se manifester dès la vingt-quatrième heure. Fluorescence.

Sur le lait : Il n'y a pas de coagulation.

Sur le lait tournesolé : Dès la vingt-quatrième heure, virage au rouge léger. A la quarante-huitième heure, la teinte bleue réapparaît (caméléonage).

Sur le sérum coagulé : Culture peu abondante.

En eau peptonée : Développement rapide et abondant; l'agitation montre des ondes moirées; apparition d'une légère colllerette dès la vingt-quatrième heure. Pas de formation d'indol.

Sur gélatine : Culture maigre n'apparaissant que le deuxième jour : pas de liquéfaction.

En eau peptonée glucosée : Développement abondant, dès la vingt-quatrième heure, avec dégagement gazeux.

En bouillon glucosé carbonaté : Après vingt-quatre heures, apparition de bulles gazeuses.

En petit lait tournesolé : La teinte passe lentement au lilas rouge, pour revenir au bleu vers le sixième jour.

Sur pomme de terre : Culture abondante, couche épaisse, jaunâtre et visqueuse.

Action sur les sucres : Le microbe attaque avec dégagement de gaz les sucres suivants : glucose, lévulose, maltose, mannite. Il est sans action sur le saccharose et le lactose.

Ce germe est enfin agglutiné à 1 p. 5.000, par un sérum antiparatyphique B. Ce dernier caractère, joint à ceux de cultures, permet de rapprocher nettement ce microbe des paratyphiques B.

INOCULATIONS EXPÉRIMENTALES. — a) *Cobaye* : Un cobaye de 500 grammes reçoit 2 cent. cubes de culture de vingt-quatre heures en bouillon Martin, sous la peau. Il meurt six heures après. L'autopsie montre des lésions de septicémie hémorragique : congestion généralisée des différents organes, particulièrement de l'intestin. Les frottis d'organes montrent de nombreux bacilles en navettes; le sang du cœur ensemencé fournit le même microbe en culture pure.

Un second cobaye de 500 grammes reçoit 1 cent. cube de la même culture dans le péritoine, il meurt en vingt-quatre heures. L'autopsie montre les mêmes lésions que ci-dessus.

b) *Souris* : Les souris qui sont inoculées sous la peau, avec 2/10^e de cent. cube de culture de vingt-quatre heures en bouillon Martin, meurent en vingt-quatre-trente-six heures de septicémie; à l'autopsie, on retrouve le microbe en navette dans les organes.

L'ingestion prolongée, pendant cinq-sept jours, de mie de pain arrosée

avec la culture, amène la mort de la souris. A l'autopsie, le sang du cœur, et les différents organes : foie, rate, etc., possèdent en abondance le microbe en navette.

c) *Lapin* : Un lapin de 2.500 grammes, résiste à 2 cent. cubes de culture inoculées par voie veineuse ; il a manifesté simplement une perte de poids de 250 grammes.

d) *Cheval* : Un cheval reçoit par la voie digestive 200 cent. cubes de culture de trente-six heures, en bouillon Martin. Après une période d'incubation de six jours, cet animal a présenté tous les signes de la maladie spontanée : fièvre atteignant 40 à 40⁵ pendant quatre jours, abattement, conjonctive couleur acajou, engorgement des membres, etc. Le sujet était complètement guéri, le quinzième jour qui a suivi l'apparition des premiers symptômes.

Une hémoculture pratiquée au moment où la réaction thermique était la plus élevée, a été positive et a donné un microbe en navette, ayant tous les caractères de celui que l'animal avait ingéré.

Au cours de la convalescence, le sérum de ce cheval a toujours fixé le complément en présence d'une émulsion du bacille isolé et, il a agglutiné ce germe à 1 p. 2.000.

Toxine. — Les toxines de ce microbe sont peu actives : des cultures filtrées sur bougies Chamberland L₂, et inoculées sous la peau, ou dans le péritoine du cobaye, provoquent une perte de poids de 60 à 80 grammes, sans le tuer. Parfois, au point d'injection sous-cutanée, apparaît une petite escarre, qui s'élimine lentement.

DÉVIATION DU COMPLÉMENT AGGLUTINATION. — Les sérum des malades ou des convalescents du 25^e régiment d'artillerie, que nous avons pu examiner en grand nombre, grâce à l'obligeance du vétérinaire, chef de service, M. Darrou, ont, dans tous les cas, fixé fortement l'alexine en présence du germe isolé. Ils agglutinaient aussi régulièrement ce microbe à des taux variant de 1 p. 500 à 1 p. 1.500.

* * *

2^e Souche « 41^e d'artillerie ». — Cette souche a été obtenue à l'état pur, de la moelle osseuse d'un os long prélevé sur un cheval mort d'« affections typhoïdes ».

CARACTÈRES DU MICROBE. — A l'état frais, en culture de vingt-quatre heures en bouillon Martin, microbe très peu mobile, ne prend pas le Gram, se colore bien au Ziehl et à la thionine phéniquée. Il se présente sous forme d'un bacille court, en navette, à extrémités plus colorées que le centre. Dans les vieilles cultures, il montre des formes plus allongées. Il n'a pas été possible de mettre des cils en évidence. Aérobie ou anaérobiose facultatif; la température optimum de développement est de 37°.

CULTURES. — *En bouillon Martin*, trois à quatre heures après l'ensemencement, apparaît un trouble uniforme, l'agitation montre des ondes moirées : le troisième jour, il se forme une petite collerette blanchâtre. Odeur fécaloïde accusée dans les vieilles cultures.

Sur gélose ordinaire : culture très abondante, en couche épaisse, d'un blanc crémeux.

Sur gélose au sous-acétate de plomb : ensemencé par piqûre, le milieu montre le troisième jour une strie brune très marquée, qui devient rapidement plus foncée. Il y a ensuite diffusion de la teinte noire à tout le milieu.

Sur gélose glucosée au rouge neutre : le virage apparaît dès le lendemain de l'ensemencement. Le quatrième jour, le virage est complet et s'accompagne de fluorescence.

Sur le lait : pas de coagulation.

Sur le lait tournesolé : vers la vingtième heure, la teinte passe au lilas rouge, puis vient franchement au rouge. Le troisième jour, le milieu est complètement décoloré. Le sixième jour, il y a un léger retour au rouge qui s'accentue, et reste fixe par la suite.

Sur sérum coagulé : la culture est peu abondante.

En eau peptonée : culture abondante avec formation d'indol.

Sur gélatine : culture maigre tardive, pas de liquéfaction.

En eau peptonée glucosée : dès la vingt-quatrième heure, culture abondante, avec production de gaz.

En bouillon glucosé carbonaté : après vingt-quatre heures, apparition de bulles gazeuses.

Sur pomme de terre : culture abondante, épaisse, d'aspect crémeux.

Action sur les sucres : le microbe attaque les sucres suivants : glucose, lactose, levulose, maltose, mannite. Aucune action n'a été relevée sur la saccharose.

Ce germe, est agglutiné par le sérum antiparatyphique B. au taux de 2 p. 1.000; il doit donc être rangé parmi les paratyphiques B. dont il se rapproche d'ailleurs par ses autres caractères culturaux et biologiques.

INOCULATIONS EXPÉRIMENTALES. — a) *Cobaye* : Un cobaye de 600 grammes, résiste à l'inoculation sous-cutanée de 2 cent. cubes de culture de vingt-quatre heures en bouillon Martin.

Un cobaye de 500 grammes, qui reçoit 1 cent. cube de la même culture, par voie péritonéale, meurt en douze heures en présentant des lésions de septicémie hémorragique : congestion généralisée des tissus et des organes (intestin, rate, foie, poumon, etc.). Le liquide péritonéal, la rate, et les reins montrent le bacille en navette, en abondance. Le sang du cœur donne une culture pure de ce microbe.

b) *Souris* : Le microbe tue régulièrement la souris par la voie sous-cutanée, à la dose de 2/10^e de cent. cube de culture de vingt-quatre heures, en bouillon Martin.

c) *Lapin* : par la voie veineuse ou sous-cutanée, le microbe est inactif.

TOXINE. — Le microbe, comme celui de la souche « 25^e d'artillerie », abandonne dans ses cultures une toxine peu active. Une culture de dix jours en bouillon Martin, filtrée sur bougie Chamberland L₃ est restée sans action, par toutes les voies d'introduction mise en œuvre : veineuse, péritonéale, sous-cutanée, aussi bien chez le cobaye que chez le lapin.

*
* *

Quatre autres des germes Gram négatifs, mobiles, étudiés, ont présenté des caractères culturaux comparables. Ils ont été

aussi agglutinés à un taux élevé par un sérum antiparatyphique B.; nous les avons donc rangés dans le groupe des bacilles paratyphyques B.

Les cinq autres germes Gram négatifs ont été éliminés de notre étude; leurs caractères culturaux les rapprochant des colibacilles.

* * *

Au cours de ces épidémies, 100 sérum de chevaux malades ou convalescents, nous ont été envoyés; nous les avons tous examinés en présence de trois antigènes différents : à streptocoques gourmeux, à paratyphyques, et à paracolibacilles équins. Nous résumons dans le tableau ci-dessous les réactions de fixation que nous avons obtenues avec ces sérum :

NATURE DE L'ANTIGÈNE	RÉACTIONS DE FIXATION		
	Positives	Légèrement positives	Négatives
Streptocoque gourmeux	22	0	78
Paratyphique B	15	0	85
Paracolibacille	"	1	99

Des épreuves d'agglutination, en présence de souches de paratyphyques et de paracolibacilles équins, ont aussi été effectuées avec 50 de ces sérum. Ayant constaté que le sérum des chevaux sains agglutine fréquemment ces bacilles au taux de 1 p. 50 à 1 p. 100, nous n'avons retenu comme positives que les réactions d'agglutination supérieures à 1 p. 200. Voici les résultats que nous avons obtenus :

ANTIGÈNES	AGGLUTINATION positive	AGGLUTINATION négative
Paratyphyques équins	23	27
Paracolibacilles équins	"	50

* * *

Il résulte donc de nos recherches que si, dans la grande majorité des épidémies d'« affections typhoïdes » du cheval, le virus filtrable de Poels est associé à des germes variés et particulièrement au streptocoque et au paratyphique B., un certain nombre d'entre elles paraissent uniquement sous la dépendance de ce dernier germe. C'est ainsi que dans l'épidémie du 25^e d'artillerie, d'où nous avons pu obtenir plusieurs souches types de paratyphiques B., les réactions de déviation du complément et d'agglutination, effectuées avec les sérum des malades et des convalescents, vis-à-vis des microbes homologues, ont toujours été très positives. D'autre part, avec une culture d'un de ces bacilles paratyphiques B., nous avons pu reproduire chez un cheval une affection ayant tous les caractères de la maladie spontanée. Ces résultats peuvent donc permettre d'envisager ces microbes comme agents étiologiques de l'épidémie. Mais, pour conclure légitimement dans ce sens, il aurait été indispensable d'éliminer la présence du virus filtrable de Poels, par inoculation de sang de chevaux malades, filtré sur bougie Chamberland L₃, à des chevaux sains, ce que les circonstances et l'éloignement ne nous ont pas permis de faire.

RECHERCHES SUR L'ANAPHYLAXIE SÉRIQUE

(PREMIER MÉMOIRE)

par E. SUAREZ

L'anaphylaxie est caractérisée par deux particularités : la période d'incubation variant avec la quantité de l'antigène sensibilisant d'une part, et l'antianaphylaxie, d'autre part, c'est-à-dire la diminution de l'hypersensibilité après le choc et sa disparition totale à la suite d'injections subintrantes.

La complexité du phénomène de l'anaphylaxie sérique a donné naissance à de nombreux travaux. Les tentatives de fractionnement du sérum sanguin n'ont pas été heureuses, la spécificité de l'anaphylaxie étant trop grande, en comparaison des moyens que fournit la chimie pour la différenciation des protéines contenues dans le sérum. Le problème se complique encore du fait de la transformation possible *in vitro* d'une protéine dans l'autre.

CARACTÈRES DES PROTÉINES DU SÉRUM SANGUIN ; LEUR DIFFÉRENCIATION CHIMIQUE.

Le sérum sanguin contient trois protéines : l'euglobuline, la sérumalbumine et la pseudoglobuline.

L'euglobuline est insoluble, à son point isoélectrique, dans de l'eau pauvre en sels, elle est précipitée par le sulfate d'ammoniaque au tiers, et par le sulfate de soude à 12-14 p. 100, et contient du phosphore. La *pseudoglobuline*, soluble dans l'eau, à son point isoélectrique, est précipitée par le sulfate d'ammoniaque à demi-saturation, et par le sulfate de soude à 18-20 p. 100, et ne renferme pas de phosphore. La *sérumalbumine* est une substance cristallisante; elle n'est précipitée ni par le sulfate d'ammoniaque à demi-saturation, ni par le sulfate de soude à 20 p. 100.

Sörensen fait remarquer que la précipitation fractionnée au moyen des sels neutres est sous la dépendance du pH, et que certaines sérumalbumines peuvent se comporter, sous l'action du sulfate d'ammoniaque, comme des pseudoglobulines.

Les auteurs ne s'accordent pas sur les différences de solubilité des deux

globulines à leur point isoélectrique et pas davantage quant à la fixation de ce point : Michaelis et Ronna donnent un *pH* de 5,6; Ruppel et Ettisch un *pH* de 6,4-6,5.

La distinction en ce qui concerne la teneur en phosphore (Hardy) est niée par Chick et Hartley qui voient une similitude chimique entre la pseudoglobuline et l'euglobuline : ils obtiennent celle-ci par dégradation de celle-là et ne trouvent ensuite aucune dissemblance entre l'euglobuline naturelle et celle qu'ils ont obtenue artificiellement.

Pour Sörensen, l'euglobuline et la pseudoglobuline n'existent pas dans le sérum à l'état de mélange simple de deux corps différents, comme pensaient les autres auteurs, qu'on puisse séparer d'une manière quantitative par leur solubilité différente dans l'eau, mais en état de combinaisons, dont la nature est encore inconnue (combinaisons chimiques vraies, combinaisons par adsorption ou solutions fixes d'une substance dans l'autre).

Ces combinaisons sont solubles dans l'eau, tant qu'elles contiennent un grand excès de pseudoglobuline, mais si l'on dilue davantage, elles se dissocient, la pseudoglobuline entre en état libre, et la combinaison restante devient de plus en plus riche en euglobuline et, par conséquent, moins soluble ; à la fin l'euglobuline est précipitée.

Cette hypothèse qui explique les contradictions des chercheurs, fait voir aussi qu'il y aurait des variétés presque illimitées d'euglobuline et de pseudoglobuline, selon le degré de purification obtenu, c'est-à-dire selon le degré de dissociation de la combinaison de ces deux corps.

DIFFÉRENCIATION BIOLOGIQUE DES PROTÉINES SÉRIQUES.

Les essais de différenciation de ces protéines par des réactions de précipitation ont donné des résultats douteux ou négatifs. La réaction de déviation du complément a donné des différences entre la globuline et la sérumalbumine, mais non pas entre les deux fractions de la globuline.

Gay et Adler ont essayé d'étudier les divers antigènes qui jouent un rôle dans l'anaphylaxie sérique. Ils ont vu que la sensibilisation par l'euglobuline s'opère après très court délai (quatre-cinq jours), mais ces résultats ont été contestés.

Les premiers essais de purification rigoureuse des antigènes sont dus à Dale et Hartley. Leurs recherches tendent à démontrer la spécificité anaphylactique de la sérumalbumine et de l'euglobuline; cette spécificité est parfois stricte, et d'autres fois, relative. Ces auteurs constatent l'anaphylaxie par l'euglobuline seulement après treize jours d'incubation et l'anaphylaxie par la sérumalbumine après un délai d'incubation de vingt-trois jours.

Doerr et Berger ont repris cette question de façon métho-

dique ; ils sont arrivés à des résultats importants en ce qui concerne la spécificité antigénique des fractions [euglobuline-sérumalbumine] (1).

Dans leurs expériences, la dose d'euglobuline nécessaire pour produire le choc d'un animal sensibilisé à la sérumalbumine, est cent fois supérieure à celle qui tue un animal sensibilisé à l'euglobuline ; par contre, la dose de sérumalbumine, nécessaire pour tuer un animal sensibilisé à l'euglobuline, est seulement quatre fois supérieure à celle qui tue l'animal sensibilisé à cette sérumalbumine. En d'autres termes, la spécificité de fraction est relative et unilatérale, fait qui doit être attribué à l'impureté des antigènes (2).

Malgré l'impureté des antigènes, ces auteurs ont pu constater que la période minima d'incubation en cas d'anaphylaxie à l'euglobuline a été de neuf jours et en cas d'anaphylaxie à la sérumalbumine de treize jours. Ils attribuent la longueur d'incubation, observée par Dale et Hartley, à la dénaturation des protéines pendant la purification.

Les résultats incertains obtenus, lors de la détermination des caractères antigènes de fractions aussi différencierées que l'euglobuline et la sérumalbumine, sont dus, à notre avis, aux méthodes chimiques, utilisées pour la séparation et la purification de ces substances. Ces méthodes sont environ cent fois moins sensibles que la réaction anaphylactique (3).

L'insuffisance que présentent les méthodes chimiques pour l'étude de la spécificité anaphylactique de fractions du sérum ressort plus nettement si l'on considère que la chimie donne une mesure quantitative et l'anaphylaxie donne, en plus, une mesure qualitative. En d'autres termes, il suffirait de 4/10.000

(1) Leur technique de séparation est un peu primitive, car sans tenir compte du *pH*, on précipite dans le sérum 4 fractions protéiques par des concentrations croissantes de sulfate d'ammoniaque.

(2) Cette seule spécificité unilatérale de fraction (lotoxicité de l'euglobuline pour les animaux sensibilisés à la sérumalbumine) nous paraît douteuse, car ces auteurs n'ont pas tenu compte de la période d'incubation de l'anaphylaxie par la sérumalbumine variable selon les doses employées à la sensibilisation.

(3) Doerr et Berger montrent qu'il suffit de 4/10.000 de milligramme d'euglobuline pour sensibiliser spécifiquement le cobaye. Les réactions chimiques les plus sensibles arrivent à nous indiquer 4/100 de milligramme de protéine totale, sans pouvoir les différencier.

de milligramme d'euglobuline contenus dans 1 milligramme de sérumalbumine pour avoir un résultat inexact.

La sérumalbumine contenant des traces de pseudo-globuline sensibilisera contre la sérumalbumine et la pseudoglobuline. Les animaux éprouvés avec de l'euglobuline, considérée comme pure et qui, en réalité, est une combinaison d'euglobuline et de pseudoglobuline, présenteront un choc anaphylactique.

Il est donc indispensable d'opérer sur de la sérumalbumine et de l'euglobuline pures.

Le critérium qui nous a servi pour la purification de la sérumalbumine est l'absence d'anticorps (1). Ce critérium nous fait connaître avec précision si 1 milligramme de sérumalbumine contient des traces de pseudoglobuline.

La différenciation précise entre l'euglobuline et la pseudoglobuline paraissait impossible parce que leurs caractères physiques et chimiques ne sont pas nettement établis, pas plus que leur teneur en anticorps.

L'impossibilité d'obtenir la totalité des anticorps liés à une fraction de globuline, par les procédés de précipitation avec des sels neutres, a incité à employer les méthodes basées sur l'insolubilité de l'euglobuline, à son point isoélectrique, dans l'eau pauvre en sels (électro-osmose, électro-dyalise, électro-ultrafiltration). Les résultats obtenus avec ces techniques sont contradictoires (Ruppel et ses collaborateurs, M. Adolf Wernicke), car le point isoélectrique ou *pH* optimum de précipitation de l'euglobuline est douleur.

TECHNIQUE DE SÉPARATION DES GLOBULINES, BASÉE SUR LA TENEUR EN ANTICORPS.

Laubenheimer et Wollmar ont séparé, par la méthode de l'électro-ultrafiltration, la totalité de l'hémolysine (sérum de lapin préparé) celle-ci étant liée à l'euglobuline. Nous avons reproduit l'expérience par le même procédé, après nous être

(1) Fait démontré par Pick et confirmé par la concentration courante des sérum antidiphthérique et antitétanique par la précipitation fractionnée avec des sels neutres. La plus grande partie des antitoxines est liée à la pseudoglobuline, le reste est dans l'euglobuline, la sérumalbumine en est dépourvue.

assuré de l'impossibilité d'y parvenir par la précipitation fractionnée avec des sels neutres.

Le dispositif de l'électro-ultrafiltration (Bechhold et Rosenberg) permet de régler le *pH* à volonté dans le sérum soumis à l'électrolyse; son système d'aspiration installé au niveau des électrodes élimine les liquides acides (anode) ou alcalins (catode), se formant au niveau des électrodes par des réactions secondaires. Cette aspiration est plus forte dans la grande électrode, ce qui fait que le liquide de la cuvette d'électrolyse devient alcalin quand la catode est dans le petit électrode intérieur; l'alcali formé dans la petite catode n'est pas si vite éliminé que l'acide formé dans l'anode. En ayant l'anode à l'intérieur, le processus est naturellement contraire et le liquide de la cuvette devient acide. Par des variations dans l'intensité de l'aspiration nous pouvons encore changer jusqu'à un certain degré le *pH* dans la cuvette d'électro-ultrafiltration.

Ce procédé met moins de temps que les autres à l'extraction des électrolytes; l'ultrafiltration n'entraîne ni dilutions ni réactions secondaires inconnues. Dans l'électro-osmose et dans l'électrodialyse le sérum subit de fortes et inévitables variations du *pH*.

Nos résultats furent à peu près les mêmes que ceux des auteurs cités. Ayant pratiqué l'électrolyse du sérum hémolytique de cheval, nous avons toujours constaté une perte considérable du titre en anticorps (30-40 p. 100) après l'électrolyse. Cette perte était due aux variations du *pH*, impossibles à éviter, à l'intensité du courant électrique employé et au chauffage produit par ce courant. Tous ces facteurs constituent pour le sérum autant de traumatismes que nous avons tâché d'éviter pour réduire les altérations au minimum.

Le *pH* fut réglé à volonté entre 7,4 et 7,2 par la combinaison d'électrodes de 42 millimètres (matras interne, catode) et de 90 millimètres (cuvette externe, anode).

Le chauffage (occasionné par l'intensité du courant et la durée — quatre à cinq heures — peut être préjudiciable de l'électrolyse) fut supprimé par l'extraction préalable de 9/10 des électrolytes du sérum au moyen de l'ultrafiltration simple : le sérum était dilué dans 10 à 15 fois son volume d'eau distillée, ultrafiltré dans de grands ultrafiltres, munis d'agitateurs, jusqu'à concentration du liquide primitif, ce qui fut obtenu en deux heures de temps.

Par ces précautions, nous sommes arrivés à conserver presque intégralement le titre d'anticorps (perte de 5 à 10 p. 100), après l'extraction complète des sels du sérum (1).

(1) Cette perte était due, dans sa plus grande partie, au prélèvement de petites quantités de sérum (0,2-0,4 cent. cubes) que l'on pratiquait plusieurs fois pendant l'électrolyse, pour mesurer le *pH*.

A quel pH faut-il précipiter l'euglobuline?

Le sérum sans sels commence à devenir trouble à pH 7,2, continue en progression jusqu'à pH 5,6-6; aux pH inférieurs, le sérum se clarifie; il le devient complètement à pH 4,5.

Nous ajustons, à la fin de l'électrolyse, le pH (1) à 6,4—6,5 qui est celui fixé par la plupart des chercheurs comme le point de précipitation optima de l'euglobuline.

L'euglobuline ainsi précipitée fut lavée et centrifugée plusieurs fois dans de l'eau distillée à pH 6,4. Elle était ensuite redissoute dans un volume de solution demi-normale de NaCl à pH 7,4, égal au volume de sérum primitif.

Le sérum restant après séparation de l'euglobuline fut laissé pendant une nuit à la glacière, et le jour suivant l'électro-ultrafiltration donnait un léger précipité se présentant avec les mêmes caractères que celui de l'euglobuline.

La pseudoglobuline était séparée au moyen de précipitation par sulfate de soude à 20 p. 100 à pH 7. Le précipité était lavé plusieurs fois en solution de sulfate de soude à 20 p. 100, afin d'éliminer ainsi la sérumalbumine entraînée dans la précipitation. La pseudoglobuline était redissoute dans une quantité d'eau égale au volume du sérum primitif.

La sérumalbumine demeurait en solution dans le sérum restant. L'excès en sulfate de soude était extrait par cristallisation à 0°; il restait une solution de sérumalbumine qui contenait 5 p. 100 de sulfate de soude.

TENEUR DES DEUX GLOBULINES EN ANTICORPS.

L'hémolysine (sérum de cheval) était liée, dans la proportion de 90-95 p. 100 à la pseudoglobuline et, dans la proportion de 5-10 p. 100, à l'euglobuline.

Les agglutinines du sérum anticholérique ou du sérum anti-rouget étaient liées pour 90 p. 100 à l'euglobuline et pour 10 p. 100 à la pseudoglobuline.

Afin d'être certains que l'euglobuline qui contenait la presque totalité des agglutinines n'entraînait une grande partie de la pseudoglobuline dans la précipitation, nous avons mélangé des parties égales de sérum anticholérique agglutinant et de sérum hémolytique.

Les fractions contenaient les quantités suivantes d'anticorps :

(1) Le pH fut mesuré par des méthodes colorimétriques avec des échelles (Michaelis et Clark) de différents indicateurs; ces échelles étaient contrôlées par des solutions-tampons.

Pseudoglobuline :

Hémolysine. 90 p. 100 Agglutinine. 10 p. 100

Euglobuline :

Hémolysine. 5-40 p. 100 Agglutinine. 90 p. 100

Sérumalbumine :

Pas d'hémolysine. Pas d'agglutinine.

Cette expérience, répétée avec différents échantillons de sérums hémolytique et agglutinant mélangés, nous donna constamment le même résultat que celui obtenu avec chaque sérum isolé. Elle nous apporta la conviction que l'euglobuline et la pseudoglobuline ont des caractères propres, quant à leur contenu en anticorps.

L'épreuve de ces fractions par la réaction d'anaphylaxie ne révéla aucune différence entre les deux globulines et seulement des différences légères entre l'euglobuline et la sérum-albumine.

Nous avons donc continué la purification des deux globulines pour avoir de l'euglobuline sans hémolysine et de la pseudoglobuline sans agglutinine.

PROPRIÉTÉS DE L'EUGLOBULINE; SA PURIFICATION

L'euglobuline totale obtenue par électro-ultrafiltration fut précipitée par des sels neutres et purifiée ensuite (reprécipitation). On obtient ainsi de l'euglobuline dépourvue d'hémolysine, mais dénaturée; elle sensibilise parfois, mais ne produit pas de choc; d'autres fois elle ne sensibilise pas. Dans cette euglobuline dénaturée les agglutinines avaient disparu.

La dilution du sérum frais dans vingt fois son volume d'eau distillée produisait constamment un précipité à partir de pH 7,2.

Par des essais répétés nous avons vérifié la pureté de l'euglobuline précipitée à pH 7, qui sensibilise seulement contre l'euglobuline. Celle obtenue à un pH plus acide était impure; elle sensibilisait contre euglobuline et contre pseudoglobuline.

Le sérum laissé pendant une demi-heure en contact avec 20 volumes d'eau distillée à pH 7, fut centrifugé. Le dépôt après centrifugation était lavé, agité dans la solution 1/15 normale de NaCl à pH 7-7,2 et centrifugé. Cette opération était répétée huit à dix fois de suite.

L'euglobuline était totalement soluble dans la solution demi-normale de NaCl à pH 7,4-7,6, si la précipitation, les lavages et centrifugations opéraient en moins de huit heures de temps; elle devenait moins soluble et commençait à se dénaturer après contact prolongé avec l'eau pauvre en sels.

L'euglobuline pure ainsi préparée contenait peu d'agglutinine (10 p. 100). Il nous est impossible d'affirmer si cette euglobuline contenait ou ne contenait pas d'hémolysine, la réaction d'hémolyse n'étant pas nette.

L'impossibilité de trouver un anticorps, indicateur de la présence de pseudoglobuline dans l'euglobuline, rendait difficile l'obtention de cette dernière à l'état pur. L'anaphylaxie était le seul moyen de nous fournir la certitude en ce qui concerne sa pureté (1).

SPÉCIFICITÉ ANTIGÈNE DE L'EUGLOBULINE.

Dans toutes les expériences portant sur la spécificité des fractions, nous avons sensibilisé avec une dose fixe de protéine (1 milligramme), afin d'éviter l'erreur provenant de la période d'incubation variable de l'anaphylaxie d'après les doses employées à la sensibilisation. L'épreuve a été faite après un délai de vingt jours d'incubation.

ANIMAL	SENSIBILISATION	ÉPREUVE	RÉSULTAT
A 79	1 milligr. euglobul.	2 doses mortelles pseudoglobul. (1 c.c.).	<i>Pas de choc.</i>
A 78	1 milligr. euglobul.	4 doses mortelles pseudoglobul. (2 c.c.).	<i>Pas de choc.</i>
A 98	1 milligr. euglobul.	6 doses mortelles pseudoglobul. (3 c.c.).	<i>Pas de choc.</i>
A 89	1 milligr. euglobul.	8 doses mortelles pseudoglobul (4 c.c.).	<i>Pas de choc.</i>

Témoins :

A 21	1 milligr. pseudogl.	Pseudoglobul. dose mortelle : 1/2 c.c.	<i>Mort en 2 min.</i>
A 70	1 milligr. euglobul.	Euglobul. dose mortelle : 1/10 c.c.	<i>Mort en 2 min.</i>
B 81	1 milligr. euglobul.	10 doses mortelles pseudogl. (2 c.c. 1/2).	<i>Pas de choc.</i>
B 82	1 milligr. euglobul.	4 doses mortelles pseudogl. (1 c.c.).	<i>Pas de choc.</i>

Témoins :

B 77	1 milligr. pseudogl.	Pseudoglobul. dose mortelle : 1/4 c.c.	<i>Mort en 3 min.</i>
B 47	1 milligr. euglobul.	Euglobul. dose mortelle : 2/10 c.c.	<i>Mort en 2 min.</i>

Témoins :

A 71	1 milligr. euglobul.	Sérum compl. dose mortelle : 1/40 c.c.	<i>Mort en 2 min.</i>
A 4	1/100 c.c. sérum compl.	Euglobul. dose mortelle : 1/8 c.c.	<i>Mort en 3 min.</i>

(1) Sur 15 opérations, contrôlées par la réaction d'anaphylaxie, nous avons obtenu seulement cinq fois de l'euglobuline pure.

L'âge du sérum joue un rôle important : nous n'avons pas réussi à obtenir de l'euglobuline pure avec le vieux sérum, non plus avec un sérum employé une semaine après la saignée de l'animal. Les sérum frais (un à quatre jours après la saignée) donnent les meilleurs résultats.

Les protéines employées à la sensibilisation, aussi bien qu'à l'épreuve, provenaient d'un même sérum et étaient fraîchement préparées; dans aucun cas elles n'étaient vieilles de plus de quatorze jours.

Toutes les solutions de protéine étaient ajustées au même volume que celui du sérum original; elles étaient conservées à la glacière en présence de quelques gouttes de chloroforme.

La pseudoglobuline injectée à des doses de une à dix fois mortelle pour les animaux sensibilisés contre cette substance, n'est pas toxique pour les cobayes sensibilisés à l'euglobuline.

Nous n'avons pas injecté une dose plus grande de pseudoglobuline parce que la dose mortelle de ce produit était, en général, de 1/3 à 1/2 cent. cube pour les animaux sensibilisés vis-à-vis d'elle (petite toxicité due à la grande perte de protéine au cours de sa purification). Il est impossible d'injecter au cobaye par voie intra-artérielle plus de 4 cent. cubes, ce volume de liquide causant par lui-même des troubles d'ordre mécanique.

Les animaux sensibilisés à l'euglobuline ont été éprouvés, sans présenter le moindre trouble, avec de la sérumalbumine, à des doses de cinq à quinze fois mortelles pour les cobayes sensibilisés à la sérumalbumine.

ANIMAL	SENSIBILISATION	ÉPREUVE	RÉSULTAT
11-49	1 milligr. euglobul.	5 doses mortelles sérumalb. (1 c.c.).	<i>Pas de choc.</i>
11-38	1 milligr. euglobul.	8 doses mortelles sérumalb. (1 c.c. 1/2).	<i>Pas de choc.</i>
11-51	1 milligr. euglobul.	12 doses mortelles sérumalb. (2 c.c. 4).	<i>Pas de choc.</i>
11-42	1 milligr. euglobul.	15 doses mortelles sérumalb. (3 c.c.).	<i>Pas de choc.</i>
<i>Témoins :</i>			
10-15/16	1 milligr. sérumalb.	Sérumalb. dose mortelle : 1/5 c.c.	<i>Mort en 3 min.</i>
11-45	1 milligr. euglobul.	Euglobul. dose mortelle : 1/40 c.c.	<i>Mort en 3 min.</i>

La sérumalbumine ne pouvait être injectée à des doses plus fortes à cause de son contenu en sulfate de soude (5 p. 100).

INCUBATION DE L'ANAPHYLAXIE PAR L'EUGLOBULINE.

Dans toutes les expériences sur la durée de l'incubation lors de l'injection de diverses fractions, nous avons cherché à établir la durée minima d'incubation.

Nos cobayes furent sensibilisés avec une dose constante de protéine : 1 milligramme (quantité correspondant à la dose optima sensibilisante du sérum complet). Ces animaux ont été éprouvés chaque jour, par voie intra-

artérielle, avec 1 cent. cube de sérum complet, à partir du lendemain de la sensibilisation.

Les recherches relatives à la période d'incubation dans le cas de l'euglobuline ont été spécialement difficiles, parce que, malgré les précautions prises pour sa purification, nous avons observé une certaine dénaturation. En plus, la difficulté d'obtenir de l'euglobuline pure ne nous a pas permis de reproduire à volonté ces expériences.

ANIMAL	ÉPROUVÉ après	SYMPTÔMES	RÉSULTAT
A 91	3 jours.	1 à 2 minutes après : secousses faibles, mais progressives; l'animal reste déprimé et meurt pendant la nuit.	<i>Choc anaphylactique?</i>
A 83	4 jours.	1 à 2 minutes après : secousses plus ou moins violentes et progressives; l'animal se gratte; le poil se dresse; faiblesse des pattes postérieures; ces symptômes se terminent après 5 à 8 minutes. Le malaise persiste.	<i>Choc net.</i>
A 92	5 jours.	Quelques frissons, le poil se dresse, léger malaise.	<i>Négatif?</i>
A 90	5 jours.	1/2 heure après : malaise et dyspnée progressive. 1 heure après, agonie; à l'autopsie : emphysème pulmonaire.	<i>Mort.</i>
A 95	5 jours.	Frissons et malaise, pas de choc. 2 heures après : malaise intense, mort dans la nuit.	<i>Mort tardive.</i>
A 88	5 jours.	Malaise; pas de choc.	<i>Malaise.</i>
A 97	5 jours.	Léger malaise et dyspnée. 1 heure après : très malade, flasque; grande dyspnée. Mort; à l'autopsie : emphysème pulmonaire.	<i>Mort.</i>
A 99	6 jours.	Se gratte, touffe, convulsions.	<i>Choc net.</i>
A 82	6 jours.	Tousse, léger malaise, dyspnée, quelques convulsions.	<i>Choc net.</i>
A 93	6 jours.	Dyspnée, malaise.	<i>Malaise.</i>
A 81	7 jours.	Se gratte; excitation; dyspnée et malaise.	<i>Choc léger.</i>
A 80	7 jours.	Se gratte, touffe, convulsions.	<i>Choc net.</i>
A 96	8 jours.	Mêmes symptômes.	<i>Choc net.</i>
A 98	10 jours.	Mêmes symptômes, mort après 4 minutes.	<i>Choc mortel.</i>

Quand l'euglobuline, employée à la sensibilisation, était pure, nous avons observé les premières manifestations de l'anaphylaxie au troisième jour après la sensibilisation. Au sixième, septième jour d'incubation, le choc était presque régul-

lièrement, typique, ou la mort de l'animal survenait dans les quatre heures qui suivaient l'injection d'épreuve. Au dixième jour d'incubation, le choc était régulièrement mortel.

Ci-dessus quelques protocoles d'expériences ; l'injection d'épreuve comportait 1 cent. cube de sérum complet.

Nous avons hésité à interpréter les symptômes produits par l'injection de sérum complet dès le troisième ou quatrième jour d'incubation, comme des manifestations anaphylactiques. Ces manifestations étaient progressives, de jour en jour plus nettes (dans certains cas nous avions un choc typique au troisième jour d'incubation) ; il nous paraît donc juste de les interpréter comme des manifestations anaphylactiques.

Les animaux témoins, sensibilisés avec 1 milligramme de sérum complet, n'ont jamais accusé des troubles avant le neuvième jour.

Plusieurs séries de cobayes, sensibilisées à l'euglobuline, commençaient à accuser des symptômes après l'injection de sérum complet, seulement à partir du sixième jour. Cette irrégularité dans les résultats trouve son explication dans le fait que l'euglobuline employée dans ces séries était impure, ces animaux ayant réagi à la pseudoglobuline avec choc mortel au douzième jour d'incubation.

PROPRIÉTÉS DE LA PSEUDOGLLOBULINE.

SA PURIFICATION, BASÉE SUR L'OBTENTION DE L'HÉMOLYSINE SANS AGGLUTININE.

Dans le sérum libre d'électrolytes, il se produit à ρH 6-6,2 un précipité plus abondant qu'à un ρH plus alcalin.

L'euglobuline précipitée dans ces conditions contenait la totalité des agglutinines (100 p. 100 comparativement au sérum total après électro-ultrafiltration), et 10 à 15 p. 100 d'hémolysine.

La pseudoglobuline renfermait 85-90 p. 100 d'hémolysine et pas d'agglutinine (elle n'agglutinait pas au 1/50, tandis que l'euglobuline agglutinait au 1/3.000), c'est-à-dire il y eut de l'hémolysine sans agglutinine.

Les animaux, sensibilisés avec 1 milligramme de pseudoglobuline et éprouvés vingt jours après, ont réagi avec choc

mortel à l'injection de sérum complet ou de pseudoglobuline, mais pas à celle de plusieurs fois la dose d'euglobuline mortelle pour les cobayes sensibilisés à l'euglobuline.

L'agglutinine est donc entièrement liée à la fraction euglobuline ; on a de la sorte la preuve de sa précipitation complète (1).

Il nous fallait maintenant débarrasser la pseudoglobuline de sérumalbumine. En l'absence d'un indicateur approprié nous avons éliminé une partie appréciable de protéine comprise entre les limites de précipitation des deux substances.

L'euglobuline totalement extraite, on réintégrait les électrolytes du sérum, on ajustait le *pH* à 7 (tamponnage par mélange de phosphates), on précipitait la pseudoglobuline par le sulfate de soude neutre et anhydre à des concentrations de 17 p. 100, 21 p. 100, 24 p. 100 ; après chacune de ces précipitations, on filtrait avec un filtre différent. On rassemblait le précipité restant dans ces différents filtres, on le lavait et on agitait en solution de sulfate de soude à 15 p. 100 à *pH* 7 ; puis on centrifugeait plusieurs fois.

Une partie du précipité était redissoute dans cette solution de sulfate de soude à 15 p. 100 (cette partie soluble était, comme nous l'avons vu dans les expériences, un mélange de pseudoglobuline et de sérumalbumine que nous avons éliminé).

La protéine précipitée par le sulfate de soude à 24 p. 100 et à *pH* 7, insoluble dans le sulfate de soude à 15 p. 100 et au même *pH*, était de la pseudoglobuline biologiquement pure ; celle-ci sensibilisait strictement contre elle-même et n'était pas toxique pour les animaux sensibilisés à la sérumalbumine.

SPÉCIFICITÉ DE LA PSEUDOGLOBULINE.

L'euglobuline, injectée à une dose qui est de 3 à 10 fois supérieure à la dose mortelle pour les animaux sensibilisés vis-à-vis d'elle-même, n'est pas toxique pour les cobayes sensibilisés à la pseudoglobuline.

(1) Ayant établi le *pH* 6-6,2 comme le point de précipitation complète de l'euglobuline dans le sérum sans sels, nous avons obtenu constamment de la pseudoglobuline sans euglobuline. Il était même superflu de nous guider sur la présence ou l'absence d'agglutinine.

ANIMAL	SENSIBILISATION	ÉPREUVE	RÉSULTAT
B 66	1 milligr. pseudogl.	5 doses mortelles euglobul. (1 c.c.).	<i>Pas de choc.</i>
B 79	1 milligr. pseudogl.	5 doses mortelles euglobul. (1 c.c.).	<i>Pas de choc.</i>
B 71	1 milligr. pseudogl.	7-8 doses mortelles euglobul. (1 c.c. 1/2).	<i>Pas de choc.</i>
B 72	1 milligr. pseudogl.	3 doses mortelles euglobul. (1/2 c.c.).	<i>Pas de choc.</i>
<i>Témoins :</i>			
B 77	1 milligr. pseudogl.	Pseudoglobul. dose mortelle : 1/4 c.c.	<i>Mort en 3 min.</i>
B 47	1 milligr. euglobul.	Euglobul. dose mortelle : 2/10 c.c.	<i>Mort en 3 min.</i>
<i>Témoins :</i>			
B 70	1 milligr. pseudogl.	Sérum compl. dose mortelle : 1/30 c.c.	<i>Mort en 3 min.</i>
B 6	1/100 c.c. sérum compl.	Pseudoglobul. dose mortelle 1/3 c.c.	<i>Mort en 3 min.</i>

Nous avons essayé de vérifier exactement la limite maxima à laquelle on pouvait injecter de l'euglobuline, sans déchaîner le choc chez les animaux sensibilisés à la pseudoglobuline. Cette euglobuline était très toxique (1/20 cent. cube, dose mortelle pour les animaux sensibilisés à l'euglobuline). Les cobayes sensibilisés à la pseudoglobuline ont reçu, sans éprouver le moindre symptôme 3/4 de cent. cube de cette euglobuline (15 doses mortelles). L'injection de 1 cent. cube (20 doses mortelles) provoqua un choc. Cette euglobuline contenait de la pseudoglobuline, comme il a été constaté à l'épreuve de la sensibilisation.

Les animaux, sensibilisés à la pseudoglobuline et éprouvés à la sérumalbumine à des doses 2 à 12 fois mortelles pour les cobayes sensibilisés vis-à-vis d'elle-même, n'ont pas manifesté le moindre symptôme.

ANIMAL	SENSIBILISATION	ÉPREUVE	RÉSULTAT
A 4	1 milligr. pseudogl.	8 doses mortelles sérumalbum. (2 c.c.).	<i>Pas de choc.</i>
A 6	1 milligr. pseudogl.	12 doses mortelles sérumalbum. (3 c.c.)	<i>Pas de choc.</i>
A 16	1 milligr. pseudogl.	12 doses mortelles sérumalbum. (3 c.c.).	<i>Pas de choc.</i>
A 10	1 milligr. pseudogl.	2 doses mortelles sérumalb. (1/2 c.c.).	<i>Pas de choc.</i>
<i>Témoins :</i>			
A 18	Pseudoglobuline.	Pseudoglobul. dose mortelle : 1/2 c.c.	<i>Mort en 3 min.</i>
C 4	Sérumalbumine.	Sérumalbum. dose mortelle : 1/4 c.c.	<i>Mort en 3 min.</i>

INCUBATION DE L'ANAPHYLAXIE
APRÈS L'INJECTION DE PSEUDOGLLOBULINE.

Les animaux sensibilisés avec 1 milligramme de pseudoglobuline ont été éprouvés chaque jour, à partir du lendemain de la sensibilisation, avec 1 cent. cube de sérum complet.

Ils ont commencé à présenter des troubles légers à partir du sixième, septième jour; ces troubles allaient en augmentant jusqu'à aboutir à un choc, au dixième jour.

ANIMAL	ÉPROUVÉ après	SYMPTOMES	RÉSULTAT
A 5	6 jours.	Légère dyspnée.	
A 20	7 jours.	Forte dyspnée; le poil se dresse; larmoient; se gratte; malaise.	<i>Pas de choc.</i> <i>Malaise.</i>
A 17	8 jours.	Mêmes symptômes.	<i>Malaise.</i>
A 26	10 jours.	Se gratte, le poil se dresse, urine, forte dyspnée; malaise prononcé, quelques convulsions.	<i>Choc net.</i>

PROPRIÉTÉS DE LA SÉRUMALBUMINE ; SA PURIFICATION.

La sérumalbumine ne renfermant pas d'anticorps, nous avions un moyen de l'obtenir à l'état pur. La constatation d'anticorps dans la sérumalbumine nous servait d'indice en ce qui concerne sa teneur en pseudoglobuline.

Nous nous sommes servi de la sérumalbumine provenant de la concentration du sérum antidiptérique; cette sérumalbumine était le résidu après précipitation de la pseudoglobuline par le sulfate de soude à 18-20 p. 100 en réaction neutre. Cette sérumalbumine sensibilise contre la pseudoglobuline et contre l'euglobuline. Sa teneur en antitoxines était de 2 unités par centimètre cube [le sérum original contenait 400 unités par centimètre cube]⁽¹⁾, c'est-à-dire qu'elle renfermait de la pseudoglobuline dans la proportion de 1/200 du sérum original.

Nous avons donc continué la purification de la sérumalbumine jusqu'à l'absence totale de pseudoglobuline, l'antitoxine diptérique nous servant toujours d'indicateur.

(1) Dans une opération faite sur une grande échelle, comme c'est le cas lors de la concentration de sérums, il y a une perte de 0,5 p. 100, représentée ici par la quantité d'antitoxine restant dans la sérumalbumine.

La sérumalbumine qui restait en solution après la précipitation des protéines du sérum par le sulfate de soude à 25 p. 100, ne contenait même pas 1/10 d'unité antitoxique, c'est-à-dire 1 milligramme de sérumalbumine ne renfermait que 1/4.000 de milligramme de pseudoglobuline. Cette sérumalbumine sensibilisait spécifiquement contre elle-même.

SPÉCIFICITÉ DE LA SÉRUMALBUMINE.

Les animaux, sensibilisés à la sérumalbumine, ont été éprouvés à la pseudoglobuline, à des doses 3 à 8 fois mortelles pour les cobayes sensibilisés à cette globuline; ils n'ont présenté aucun trouble.

ANIMAL	SENSIBILISATION	ÉPREUVE	RÉSULTAT
8-53/56	1 milligr. sérumalb.	2 doses mortelles pseudoglob. (1 c.c.).	<i>Pas de choc.</i>
8-94/93	1 milligr. sérumalb.	3 doses mortelles pseudoglob. (1 c.c. 1/2).	<i>Pas de choc.</i>
8-64/65	1 milligr. sérumalb.	6 doses mortelles pseudoglob. (3 c.c.).	<i>Pas de choc.</i>
8-70/71	1 milligr. sérumalb.	8 doses mortelles pseudoglob. (4 c.c.).	<i>Pas de choc.</i>
<i>Témoins :</i>			
8-88/89	1 milligr. sérumalb.	Sérumalb. dose mortelle : 1/3 c.c.	<i>Mort en 3 min.</i>
12-21/22	1 milligr. pseudogl.	Pseudogl. dose mortelle : 1/2 c.c.	<i>Mort en 3 min.</i>
<i>Témoins :</i>			
8-57/58	1 milligr. sérumalb.	Sérum complet, dose mortelle : 1/50 c.c.	<i>Mort en 3 min.</i>
10-66/67	1/100 c.c. sérum compl.	Sérumalb. dose mortelle : 1/4 c.c.	<i>Mort en 3 min.</i>

La pseudoglobuline employée à cette épreuve était sûrement mortelle, à la dose de 1/2 cent. cube, pour les animaux [2] sensibilisés à la pseudoglobuline.

ANIMAL	SENSIBILISATION	ÉPREUVE	RÉSULTAT
8-41/42	1 milligr. sérumalb.	30 doses mortelles euglob. (3/4 c.c.).	<i>Pas de choc.</i>
8-98/99	1 milligr. sérumalb.	40 doses mortelles euglob. (1 c.c.).	<i>Pas de choc.</i>
8-84/85	1 milligr. sérumalb.	80 doses mortelles euglob. (2 c.c.).	<i>Pas de choc.</i>
<i>Témoins :</i>			
8-87/88	1 milligr. sérumalb.	Sérumalb. dose mortelle : 1/4 c.c.	<i>Mort en 3 min.</i>
11-52	1 milligr. euglobul.	Euglobul. dose mortelle : 1/40 c.c.	<i>Mort en 2 min.</i>

Les animaux, sensibilisés à la sérumalbumine, résistent, sans présenter le moindre symptôme, à l'injection de 40-80 fois la dose mortelle d'euglobuline, pour les cobayes sensibilisés à l'euglobuline.

INCUBATION APRÈS L'INJECTION DE SÉRUMALBUMINE.

Chez les animaux sensibilisés avec 1 milligramme de cette protéine, la réinjection de sérum complet provoquait des troubles, seulement à partir du neuvième ou dixième jour d'incubation. Il y avait un choc typique au douzième ou treizième jour, et un choc mortel après le quatorzième ou quinzième jour d'incubation.

Dans quelques cas nous avons observé (comme au commencement de l'hypersensibilité à l'euglobuline) que l'injection d'épreuve ne provoquait pas un choc typique, mais l'animal présentait un malaise et mourait quelques heures après l'injection (1).

STABILITÉ DES CARACTÈRES ANTIGÈNES DES PROTÉINES SÉRIQUES.

Moll, en 1904, avait observé qu'une solution de sérumalbumine en réaction alcaline, chauffée à 60°, se transformait partiellement en pseudoglobuline. Chick et Martin voient la transformation *in vitro* de la pseudoglobuline en euglobuline. Ces auteurs, comme Hartley, ne trouvent pas de différence chimique entre l'euglobuline artificielle et naturelle.

C'est un fait connu que les sérum vieux ou chauffés donnent un précipité plus abondant d'euglobuline et de pseudoglobuline que les sérum frais. Nous avons observé qu'il est impossible d'obtenir de l'euglobuline pure en partant d'un sérum vieux.

Ruppel et ses collaborateurs affirment que la sérumalbumine se transforme en euglobuline en passant par la phase pseudoglobuline.

Il nous parut intéressant de voir si la transformation d'une protéine était seulement apparente (dénaturation avec précipitabilité accrue) ou s'il s'agissait d'une vraie transformation accompagnée de changements de leur spécificité antigène.

Nous avons laissé la sérumalbumine pure vieillir pendant deux ou trois mois. Elle se révéla, au sulfate de soude, comme

(1) Les différents pouvoirs sensibilisants des protéines sériques isolées doivent être encore beaucoup plus marqués dans le sérum intact. La difficulté de séparation des protéines sériques et leur rapide dénaturation à l'état pur, nous fait croire, avec Sørensen, qu'elles se trouvent dans le sérum liées sous forme de combinaisons complexes. Ces combinaisons nous semblent impossibles à dissocier sans subir d'altération.

un mélange de beaucoup d'euglobuline, de pseudoglobuline et de peu de sérumalbumine.

Les animaux, sensibilisés avec 1 milligramme de ces globulines artificielles, réagirent, au trentième jour d'incubation seulement, contre la sérumalbumine, au même titre que ceux sensibilisés avec de la sérumalbumine fraîche.

La même épreuve a été faite avec de la pseudoglobuline ayant après deux mois de vieillissement des caractères d'euglobuline; cette pseudoglobuline sensibilisa seulement contre elle-même.

Ces expériences démontrent que les protéines du sérum conservent intacte leur spécificité antigène.

RÉSUMÉ.

L'euglobuline, la pseudoglobuline et la sérumalbumine se comportent comme des antigènes différents; chacun de ces derniers sensibilise spécifiquement, il est toxique pour les animaux sensibilisés avec du sérum complet et avec l'antigène correspondant.

La spécificité des fractions voisines (pseudoglobuline-euglobuline, pseudoglobuline-sérumalbumine) est telle que les animaux sensibilisés avec une fraction résistent à 10-15 doses mortelles d'une autre fraction.

La spécificité des fractions éloignées (euglobuline-sérumalbumine) est telle que les animaux sensibilisés avec une de ces fractions, résistent à 15-80 doses mortelles d'une autre fraction.

Ces antigènes sensibilisent après des périodes d'incubation différentes. Le délai minimum d'incubation (neuf à douze jours), propre à l'anaphylaxie sérique, se trouve réduit, dans l'anaphylaxie euglobulinique, à trois à six jours; il est de douze à quatorze jours dans l'anaphylaxie sérumalbuminique, et de huit à dix jours dans l'anaphylaxie pseudoglobulinique.

(*Travail du Laboratoire de M. Besredka, Institut Pasteur.*)

BIBLIOGRAPHIE

ADOLF. *Klin. Woch.*, **2**, 1924, p. 1214.

ADOLF et PAULI. *Biochemische Zeitsr.*, **152**, 1924, p. 360.

BECHHOLD. *Zeitsr. f. Elektrochem.*, **9**, 1925.

BECHHOLD et ROSENBERG. *Biochemische Zeitsr.*, **157**, 1925, p. 85.
BESREDKA. *Anaphylaxie et Antianaphyl*, Masson, 1917.
CHICK. *Biochemical Journal*, **8**, 1714, p. 261.
CHICK. *Biochemical Journal*, **8**, 1914, p. 404.
CHICK. *Biochemical Journal*, **7**, 1913, p. 318.
DALE et HARTLEY. *Biochemical Journal*, **10**, 1916, p. 408.
DOERR et BERGER. *Zeitsr. f. Hygiene*, **96**, 1922, p. 191.
DOERR et BERGER. *Zeitsr. f. Hygiene*, **96**, 1922, p. 258.
DOERR et RUSS. *Zeitsr. f. Inmunitätsf.*, **2**, 1909, p. 109.
DOERR et RUSS. *Zeitsr. f. Inmunitätsf.*, **3**, 1909, p. 181.
ETTISCH et BECK. *Deut. Med. Woch.*, **2**, 1925, p. 1950.
GAY et ADLER. *Journal of Med. Res.*, **13**, 1908, p. 433.
HARDY. *Journal of Physiol.*, **33**, 1905, p. 251.
HARTLEY. *Biochem. Journal*, **8**, 1914, p. 541.
HASLAM. *Biochem. Journal*, **7**, 1913, p. 492.
LAUBENHEIMER et WOLLMAR. *Zeitsr. f. Hygiene*, **106**, 1926, p. 202.
MICHAELIS et RONA. *Biochemische Zeitsr.*, **27**, 1910, p. 38.
MICHAELIS et RONA. *Biochemische Zeitsr.*, **28**, 1910, p. 193.
MOLL. *Beiträge*, **4**, 1904, p. 563.
MOLL. *Beiträge*, **7**, 1906, p. 341.
PAULL. *Biochemische Zeitsr.*, **152**, 1924, p. 355.
PICK. *Hofmeister Beiträge*, **1**, 1902, p. 387.
RUPPEL, ORNSTEIN, CARL et LASCH. *Zeitsr. f. Hygiene*, **97**, 1923, p. 188.
SÖRENSEN, « Proteins » (Conf. of Carlsberg Laboratorium), Fleischman Comp., 1925.
SÖRENSEN. *Annales de Brass. et Dist.*, **14**, 1927.
WERNICKE et MODERN. *C. R. Soc. Biol.*, **95**, 1926, p. 807.
WOLLMAN et SUAREZ. *C. R. Soc. Biol.*, **96**, 1927, p. 15.

CULTURES DU *TRICHOPHYTON GYPSEUM*
EN DEHORS DE L'ORGANISME ET DES MILIEUX USUELS
(VITALITÉ ET VIRULENCE.
REMARQUES ÉPIDÉMIOLOGIQUES)

par D. BROCG-ROUSSEAU, Ach. URBAIN et J. BAROTTE.

La prophylaxie des teignes animales comporte, parmi les mesures primordiales, l'enlèvement et la désinfection, ou, mieux encore, la destruction des litières contaminées par la chute de poils parasités, de croûtes, de squames épidémiques. Il nous a paru intéressant de chercher, d'abord, à préciser si les champignons, parasites des teignes, conservaient simplement leur vitalité dans ce milieu extérieur ou s'ils étaient susceptibles d'y végéter et de s'y développer. C'est pourquoi nous avons essayé de les cultiver sur les éléments mêmes que l'on trouve le plus généralement dans les litières : paille, poils, débris de corne, grains d'avoine, crottin.

Un deuxième but nous engageait à tenter ces cultures : l'espoir de trouver sur ces milieux naturels, pauvres en éléments nutritifs, une autre forme de résistance dans une station naturelle des dermatophytes des teignes, ou peut-être même une forme de fructification élevée.

MILIEUX DE CULTURE UTILISÉS. — Nous avons placé dans divers tubes à cultures :

1^o Des *brins de paille*, munis de leurs épis, coupés à des dimensions légèrement inférieures à la taille du tube ;

2^o Des *grains d'avoine* ;

3^o Des *poils*, tels qu'ils sont recueillis au pansage de chevaux sains, c'est-à-dire renfermant encore de la crasse (sueur et excrétions sébacées) et de nombreux débris épidémiques ;

4^o De petits agglomérats de *crottin* ;

5^o Des fragments de *corne*, provenant du parage des sabots du cheval à la maréchalerie.

Paille, avoine, poils et crottins sont additionnés d'eau du robinet (1/4 du tube environ), afin de conserver au milieu l'humidité nécessaire au développement des teignes, condition favorisante que l'on trouve dans les litières. Les fragments de corne, choisis ou taillés à la taille du tube, sont placés dans des tubes à pomme de terre, remplis également d'eau ordinaire jusqu'à l'étranglement, de façon que le niveau supérieur du liquide effleure la corne.

Les tubes ainsi préparés sont stérilisés à l'autoclave à 120°, pendant une demi-heure, opération qu'il est bon de renouveler une deuxième fois, après vingt-quatre heures, pour garantir la stérilité de ces milieux normalement très pollués de germes aérobies à spores résistantes. Un contrôle de trois à quatre jours, à l'étuve, est nécessaire avant l'ensemencement de ces milieux.

ENSEMENCEMENTS. — Nous avons choisi pour ces essais une souche de *Trichophyton gypseum* d'origine équine, provenant de nos isolements pratiqués sur des prélèvements provenant de chevaux teignous de divers régiments.

Ce choix était surtout motivé par la facilité de récolter, à la surface de la gélose Sabouraud, la culture plâtreuse abondante du *Trichophyton gypseum* et d'obtenir des émulsions assez épaisses de ses spores en eau physiologique. Le *Microsporum equinum*, par suite de son adhérence à la surface de la gélose, et le *Trichophyton equinum* avec ses cultures ouatées se prétaient moins bien aux manipulations; quant à l'*Achorion gypseum*, avec ses fuseaux abondants, sa culture était facile également à émulsionner, mais nous avons vu que c'était une dermatophytie d'exception chez le cheval.

L'émulsion d'une culture sur gélose Sabouraud de *Trichophyton gypseum* (culture de quinze jours à trois semaines) est pratiquée, en eau physiologique, dans un petit ballon stérile contenant des perles de verre. Par agitation, on obtient une fine division de culture; le milieu contient en suspension de nombreuses spores libres comme on peut le constater au microscope (préparation à l'état frais entre lame et lamelle; obj. 4, ocul. 5).

Un ensemencement de contrôle sur gélose ordinaire inclinée permet de constater, au bout de vingt-quatre heures d'étuve, si

toutes ces manipulations ont bien été pratiquées aseptiquement, et si l'émulsion de spores de *Trichophyton* est bien pure de toute contamination bactérienne accidentelle.

L'émulsion est répartie à la pipette, à la surface des divers milieux (corne, tiges de paille et épis) ou dans leur masse (poils, avoine, crottin) de façon à obtenir un ensemencement aussi régulier que possible des spores.

ASPECT DES CULTURES. — Les tubes sont placés à l'étuve à 20° ou 22° (soit même à la température du laboratoire).

La culture n'est visible qu'au bout de quelques jours (quatre à huit jours). Elle se manifeste par l'apparition progressive d'un petit dépôt pulvérulent, blanchâtre, à la surface des grains, des tiges et des épis de blé, du crottin et de la corne. Le développement se manifeste le plus abondamment au niveau des points où les spores émulsionnées ont été s'amasser de préférence (insertion des épis, nodosités des tiges (fig. A), sillon médian des grains d'avoine, parties en creux des agglomérats de crottin). Pour la corne, c'est vers les régions déclives, à la partie inférieure du fragment, que la culture se manifeste avec le plus d'intensité, soit que le dépôt des spores y ait été plus abondant à l'ensemencement, soit que le degré plus accusé d'humidité y soit plus favorable au développement du parasite (fig. B). Les poils ou crins sont irrégulièrement envahis d'un petit dépôt blanchâtre, comme s'ils avaient été saupoudrés de talc.

Au bout de quinze jours à trois semaines, la culture ne présente plus d'augmentation très apparente. Une partie des régions où elle s'est manifestée tendent d'ailleurs à se dessécher et on a l'impression d'avoir affaire à des produits (fragments de fourrages ou grains) moisis.

La description précédente s'applique aux portions du milieu restées à l'air libre dans le tube. Dans l'eau naturelle ajoutée au fond des tubes pour y maintenir l'humidité nécessaire, on voit parallèlement se développer quelques petits flocons mycéliens à aspect muqueux, visqueux, tout à fait analogues à ceux que l'on rencontre dans les milieux liquides (bouillon glucosé) quand on ensemence des fragments de culture de teignes à leur surface.

A la limite de séparation des liquides et de la zone non immergée des milieux, se forme petit à petit une pellicule gaufrée tout à fait semblable à la pellicule mycélienne que l'on trouve à la surface des milieux liquides riches, par exemple, des bouillons glucosés employés pour la préparation des trichophytines; cette pellicule blanc jaunâtre a les mêmes tendances à brunir par sa partie inférieure en vieillissant.

Tels sont les principaux caractères observés : ils se modifient fort peu par la suite jusqu'à la dessiccation progressive complète du contenu des tubes, si l'on n'a soin d'y ajouter de l'eau.

Il n'y a rien de très exceptionnel à voir pousser le *Trichophyton* sur les fragments de corne ni sur les poils, car s'il s'agit de milieux évidemment très pauvres en éléments nutritifs usuels, ceux-ci sont riches en kératine, tant par eux-mêmes (corne), que par les débris épidermiques qu'ils entraînent avec eux (poils). L'affinité particulière des dermatophytes pour les tissus kératinogènes ou kératinisés (couches superficielles du derme, épiderme, poils, ongles) pouvait à la rigueur faire prévoir ce résultat.

VITALITÉ. — Nous avons abandonné à la température du laboratoire toutes ces cultures avec l'intention de les conserver le plus longtemps possible pour juger ensuite de leur vitalité. La plupart des tubes ont malheureusement été, peu à peu, envahis, à travers le coton, par des moisissures banales, surtout ceux où un degré d'humidité élevé avait été maintenu en renouvelant l'eau du culot. Seuls restaient quelques échantillons des cultures sur paille de blé et sur fragments de corne, en état de dessiccation complète (surtout les fragments de corne). Après les avoir fait photographier, nous avons procédé à l'ouverture des tubes en février 1928 et à l'ensemencement de ces cultures desséchées de *Trichophyton gypseum* en divers milieux : bouillon glucosé, gélose Sabouraud, jus de carotte, fragments de carottes et pommes de terre. Ce repiquage des cultures abandonnées depuis novembre 1925, ayant eu lieu fin février 1928, il était possible de douter de leur vitalité au bout de ces deux ans et trois mois.

Effectivement, les ensemencements pratiqués en partant de



A

B

FIG. A et B. — Culture du *Trichophyton gypseum* sur des brins de paille de blé,
et sur un fragment de corne (Novembre 1925).

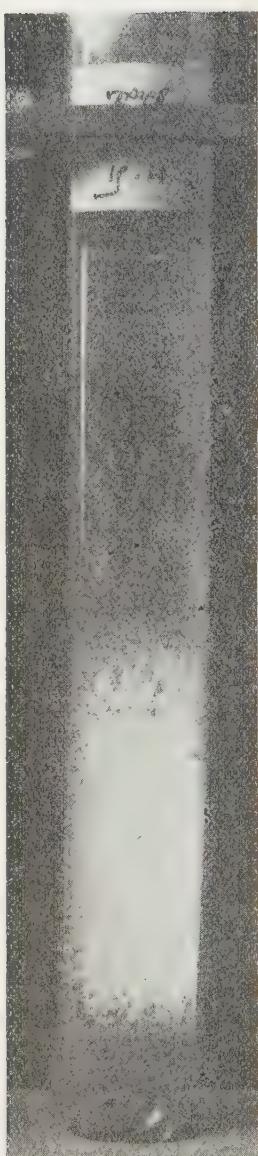


FIG. C.—Culture typique de *Trichophyton gypseum* obtenue par ensesemencements prélevés du tube A et portés sur gélose Sabouraud.

(Avril 1928.)

la corne n'ont pas été couronnés de succès; par contre, ceux provenant des tiges et épis de blé ont tous été positifs.

Sur carotte, on observe au bout de quelques jours des colonies punctiformes, blanchâtres, qui ne tardent pas à envahir le milieu.

Sur jus de carotte, il se forme un voile, s'épaississant assez rapidement; il est de couleur blanchâtre à sa surface, qui devient irrégulière, de teinte jaune ocre, ayant tendance à brunir par la face, en contact du liquide. Sur gélose Sabouraud, les cultures ne se sont manifestées que plus lentement; très adhérentes à la gélose, elles n'avaient pas d'abord l'aspect caractéristique des cultures de *Trichophyton*, étant glabres, de couleur variable, blanches en certains points, plus foncées en d'autres régions. Par repiquages successifs en milieu Sabouraud des parties blanchâtres du mycélium de ces cultures, nous obtenions en quelques semaines des cultures absolument typiques de *Trichophyton gypseum* d'un blanc plâtreux, nettement auréolées de rayons divergents poudreux, et d'aspect plâtreux caractéristique (fig. C).

CONSERVATION DE LA VIRULENCE. — Il était indiqué de rechercher si les cultures ainsi conservées en milieu dysgénésique pendant plus de deux ans, avaient gardé leur virulence pour les animaux. Une culture de quinze jours à trois semaines, provenant du premier repiquage sur milieu Sabouraud des produits prélevés sur les épis de blé,

est inoculée à deux cobayes, selon la technique habituelle. La culture est broyée dans un mortier, émulsionnée en eau physiologique, puis appliquée à l'aide d'un tampon de coton sur des scarifications pratiquées sur le dos de ces animaux. Un cobaye meurt accidentellement trois jours après l'inoculation; l'autre présente, douze jours après les scarifications infectantes, une rougeur au niveau des cicatrices, puis des squames et de petites croûtes séro-sanguines entourant les poils par touffes. L'examen microscopique de ces poils ainsi que leur ensemencement sur gélose Sabouraud confirment qu'il s'agit de *Trichophyton gypseum* typique.

FORME DE RÉSISTANCE DANS UNE STATION NATURELLE DES CHAMPIGNONS DE DERMATOPHYTIES. — L'étude morphologique de ces cultures vieillies dans les divers milieux naturels pauvres que nous avions utilisés, serait vraisemblablement très instructive. Elle est délicate car tout prélèvement à la surface de ces milieux, sur des cultures en voie de dessiccation ou desséchées, détruit, si délicatement soit-il pratiqué, les rapports normaux des éléments (spores ou fragments mycéliens) et ne révèle, à l'examen ultérieur, que des éléments isolés ou mutilés. L'examen entre lame et lamelle (examen à l'état frais dans du lacto-phénol ou dans une gouttelette d'eau) nous a révélé, pour les prélèvements provenant de vieilles cultures sur paille et épis de blé, l'existence abondante de spores rondes, très comparables à celles des cultures du même *Trichophyton* en milieu Sabouraud. Tout au plus ces spores paraissent-elles un peu plus opaques et à membrane un peu plus épaisse que celles de cultures plus jeunes examinées par comparaison. Parfois isolées, nous en avons trouvé aussi de véritables amas agglomérés, sans qu'il soit possible de noter leur mode d'assemblage ni leur insertion sur un mycélium quelconque. Nous pensons néanmoins que c'est cette forme sporulée qui a assuré la survivance du *Trichophyton* pendant plus de deux ans ainsi que sa virulence pour les animaux de laboratoire; nous la considérons comme la forme de résistance dans la nature.

Nous mentionnerons, pour mémoire, d'autres formes également unicellulaires, trouvées au cours des mêmes examens

microscopiques : il s'agit, d'une part, de cellules ovoïdes, de taille légèrement supérieure à celle des spores, aplatis à un de leurs pôles et renfermant un protoplasma granuleux ; d'autre part, de nombreux bâtonnets à extrémités arrondies, très réfringents, de taille supérieure à une grosse bactéries, inférieure à une levure, sans différenciation particulière de leur protoplasma.

Toute interprétation que nous pourrions avancer actuellement sur ces deux dernières formes ne serait qu'hypothétique et risquerait d'être erronée puisque nous n'avons pu saisir leurs rapports anatomiques normaux, ni suivre leur développement ultérieur en gouttes pendantes.

Ces renseignements sont insuffisants pour apporter des précisions nouvelles concernant les formes possibles de « fructification » des dermalophytes permettant leur classification botanique rationnelle plus certaine. Par contre, ces nouvelles observations appuient notre conviction que ce n'est pas dans des milieux naturels ou artificiels riches en éléments nutritifs qu'il faut chercher les formes d'évolution de ces champignons. Sabouraud a déjà, depuis longtemps, démontré que leur culture en milieux sucrés n'aboutit qu'à un pléomorphisme définitif où se fusionnent les caractères distinctifs des espèces, sous formes de fructification, d'où il est difficile ou impossible de les faire regresser vers l'état primitif typique, celui-ci ne se maintenant que sur gélose peptone (milieu de conservation). Il semble que l'étude morphologique des teignes et des diverses dermatophyties serait plus fructueuse si elle était orientée vers l'observation de leurs cultures en milieux pauvres, cherchant à se rapprocher autant que possible des conditions végétatives que ces dermatophytes peuvent rencontrer dans le milieu extérieur, quand ils ne sont pas à l'état de parasitisme. L'observation précédente, tout incomplète qu'elle soit, montre que le *Trichophyton gypseum* ne reste pas fatallement inerte dans le milieu extérieur quand il a quitté le tégument de l'animal teigneux.

Sa culture peut se réaliser dans des conditions de température et d'humidité assez précaires sur les divers produits d'origine kératinogène : squasmes, poils, crins, corne, en dehors de l'organisme vivant. Nous venons de voir même

qu'il peut végéter à la surface de substances végétales ou de leurs débris (avoine, paille, épis, crottin).

Notons enfin que dans ces conditions, la forme de résistance, dans une station naturelle de ces dermatophytes est extrêmement simple puisqu'il s'agit d'éléments unicellulaires (spores). Ce cas n'est pas particulier aux parasites des teignes ; l'un de nous a déjà étudié le double état morphologique des Streptothricées et a montré que le *Streptothrix*, cause de l'altération des avoines moisies, vit sur les grains d'avoine sous une forme sporulée particulière qui est une forme de résistance. Il en est de même pour d'autres champignons, et l'étude des Mucédinées dans leur station naturelle permettrait sans doute d'acquérir quelques notions nouvelles concernant certaines de ces espèces.

Malheureusement, on n'a, le plus souvent, aucune indication sur la station naturelle probable de ces champignons inférieurs. En ce qui concerne les champignons des teignes, on pouvait penser, avec quelque apparence de vérité, que cette station était un support végétal ou une partie de la peau de l'animal lui-même.

La corne avait été choisie, quelque bizarre que puisse paraître ce milieu de culture, en raison du fait suivant :

On trouve très rarement sur les sabots abandonnés de chevaux morts, un champignon de la famille des Ascomycètes, très petit, ayant la forme d'une très courte épingle de quelques millimètres. Ce champignon appartient au genre *Onygena* et l'espèce s'appelle *Onygena equina* Pers. (1).

L'hypothèse que cet *Onygena* pouvait avoir quelques relations avec les champignons des teignes avait été émise, au cours de conversations avec l'un de nous, par le savant mycologue Matruchot. C'était dans le but de vérifier cette hypothèse que nous avions fait ces cultures sur corne ; le fait que nous n'avons pu obtenir une forme parfaite ne doit cependant pas arrêter les recherches dans cette voie. Il est extrême-

(1) Genre *Onygena* Pers. (*onyx* : ongle, *genea* : génération) Ascomata globosa, stipitata vel sessilia, membranacea, fragilia, decidua; asci globosi, tenuissimi e capillitio ramoso exorientes, octospori; sporidia continua, ellepsoides, hyalina, v. diluta colorata, mox pulvrea; *On. equina*, in cornibus et unguibus mammalium quorumdam, imprimis equi et caprae; Saccardo. *Sylloge fungorum*, 8, p. 861.

ment rare de rencontrer l'*Onygena* : mais si quelque mycologue trouvait cette espèce, il faudrait essayer de suite d'en obtenir des cultures pures, et de voir si par dégradation morphologique on ne pourrait pas obtenir les formes que nous connaissons actuellement à ces dermatophytes.

CONSIDÉRATIONS RELATIVES A L'ÉPIDÉMIOLOGIE DES TEIGNES. — La démonstration du fait que les dermatophytes peuvent conserver très longuement leur vitalité d'une part, leur virulence d'autre part, dans le milieu extérieur et en particulier à la surface de substances végétales, permet de mieux comprendre le rôle, pratiquement déjà bien connu des litières, dans la transmission de ces affections cutanées.

La résistance peu commune des spores dans le milieu extérieur explique le fait que nous signalions dans une étude précédente sur les teignes du cheval, de la persistance dans certains locaux (annexes de remontes, écuries régimentaires) d'une certaine forme déterminée de teigne, à l'exclusion de toute autre (Microsporie ou Trichophytie) qu'on retrouve périodiquement dans les effectifs occupant ces locaux, même lorsqu'ils ont été évacués pendant un laps de temps important.

On s'explique de même que certaines formes de teigne soient régionales chez nos animaux domestiques.

La rareté des Favus (2,5 p. 100) pourrait peut-être s'expliquer par une résistance des fuseaux de l'*Achorion gypseum*, pluriseptés, moindre dans le milieu extérieur que celle des spores des autres Trichophyties. De même, l'abondance relative (72,5 p. 100) des microspories animales par rapport aux trichophyties (25 p. 100), trouverait peut-être son explication dans une résistance plus grande encore des petites spores des *Microsporum*.

Il s'agit là d'hypothèses que nous n'avons pas vérifiées personnellement, mais que suggère cette observation. Nous les proposons simplement aux chercheurs qu'elles intéresseraient, en signalant l'observation que nous avons déjà faite de la résistance particulière des microspories du *Microsporum equinum*. Une culture de ce *Microsporum* complètement desséchée sur milieu Sabouraud de conservation (gélose peptone), depuis plus de trois ans, nous a donné des cultures absolument

typiques et dans les délais normaux dès leur premier réensemencement sur gélose glucosée.

Rappelons enfin combien les manifestations de teignes équines apparaissent parfois d'une manière soudaine, pour ainsi dire explosive, sur un assez grand nombre de chevaux d'un effectif, sans rapports de voisinage immédiat. Il s'agit le plus souvent, dans ce cas, de formes d'herpès miliaires se manifestant d'emblée sur de larges surfaces : dos, tête et encolure de préférence. Cette apparition quasi spontanée, sur des régions particulièrement exposées à la souillure des poussières tombant des fourrages consommés au râtelier, devrait suggérer aux praticiens étonnés de ces manifestations cliniques, l'hypothèse d'une contamination par les fourrages. La possibilité que nous venons de démontrer de voir les dermatophytes cultiver, même abondamment sur les milieux végétaux vient à l'appui de cette hypothèse. Enfin, nous avons également montré expérimentalement (1) qu'en faisant ingérer à des cobayes 2 cent. cubes d'émulsion de spores de *Trichophyton* et en pratiquant aussitôt des scarifications sur le dos, on provoque, quinze jours environ après l'ingestion, l'évolution de plaques de teigne au niveau des points scarifiés. Ce fait expérimental est à rapprocher de la consommation possible par les chevaux, de fourrages fortement infestés de spores de dermatophytes ; les micro-traumatismes résultant d'un passage trop énergique avec une brosse en chiendent usée et très dure, ou avec l'étrille, jouant le rôle des scarifications de nos expériences.

Les localisations cliniques habituelles des herpès miliaires, apparemment spontanées, répondent à cette interprétation : dos et encolure (région d'abord facile où le pansage s'exerce d'une façon particulièrement accessible aux érosions de la brosse ou de l'étrille). Si cette étiologie n'est pas démontrée, le rapprochement des faits nous paraissait mériter d'être signalé.

EN RÉSUMÉ : Les points principaux qui ont attiré notre attention dans cette observation sont les suivants :

Un échantillon de *Trichophyton gypseum*, d'origine équine, donne des cultures abondantes sur milieux pauvres en élé-

(1) Ces *Annales*, 41, mars 1927, p. 546.

ments nutritifs tels que : paille et épis de blé, grains d'avoine, poils, crottin, débris de corne. Ce fait montre que les dermatophytes des teignes animales, expulsées de l'organisme, sont susceptibles, non seulement de se conserver dans le milieu extérieur (litières, fourrages), mais d'y trouver des éléments propres à leur développement sans nécessiter des conditions tout à fait exceptionnelles de température, d'humidité ni d'obscurité.

La *vitalité* de ces cultures est très grande : plus de deux ans et trois mois sur un échantillon de paille (*Trichophyton gypseum*), plus de trois ans sur un milieu nutritif pauvre desséché (*Microsporum equinum*). Ces délais sont ceux qui ont été constatés, mais auraient très certainement pu être dépassés.

La *virulence* de ces cultures pour les animaux est conservée dans les conditions d'existence précaire où végète le champignon.

Les *formes de fructification* propres à préciser la classification botanique des dermatophytes sont à rechercher de préférence sur des cultures âgées en milieux relativement pauvres en éléments nutritifs. Les *formes de résistance*, l'état de station naturelle de ces mêmes dermatophytes paraissent être des éléments unicellulaires (spores) qui assurent la vitalité et la virulence (Analogie avec les Streptothricées. Cas incomplètement connu de l'*Onygena equina*).

Ces constatations pourraient expliquer certaines données épidémiologiques qui concernent les dermatophyties animales : survie d'une race déterminée de dermatophyte (soit *Trichophyton*, soit *Microsporum*), dans certains locaux, même après évacuation prolongée ; répartition régionale de certaines teignes.

Le rapprochement des faits expérimentaux, s'il ne la démontre pas d'une manière absolue, apporte, du moins, des arguments à l'hypothèse de la possibilité pour les teignes animales de se transmettre par les fourrages (transmission directe du même par voie digestive).

ACTION COAGULANTE ET ANTICOAGULANTE DES SÉRUMS COAGULABILITÉ DES PLASMAS NORMAUX

par les Drs VITAL BRAZIL et J. VELLARD.

Les observations réalisées au cours de l'étude de l'action des venins sur la coagulation du sang nous ayant montré l'importance du facteur spécifique et individuel dans tous ces phénomènes, nous avons étendu nos recherches à la coagulation sanguine normale, afin d'en suivre les modifications dans toute l'échelle zoologique.

La coagulation sanguine a fait l'objet d'innombrables travaux et de nombreuses théories ont été proposées pour en expliquer le mécanisme; mais quelle que soit la terminologie et la théorie que l'on adopte, kinésique, chimique ou physique, deux faits dominent ce phénomène; le plasma circulant dans les vaisseaux est coagulable, mais ne contient pas de substance coagulante; extrait des vaisseaux, il se coagule plus ou moins rapidement suivant les espèces, par suite de l'apparition d'une substance coagulante sur la nature et l'origine de laquelle on n'est pas d'accord, et qui se retrouve, après la rétraction du caillot, dans le sérum exsudé. *In vitro*, le sérum ainsi obtenu coagule le plasma normal ou artificiellement stabilisé, fournissant un moyen très simple de reproduire et d'étudier expérimentalement le mécanisme de la coagulation sanguine.

Les deux phénomènes, pouvoir coagulant du sérum et coagulabilité du plasma, présentent chacun des propriétés spécifiques caractéristiques, et de leurs variations respectives dépend la plus ou moins grande coagulabilité du sang. Ces variations sont indépendantes l'une de l'autre et, à un sérum faiblement coagulant peut correspondre un plasma très coagulable, comme chez le chat ou le chien; inversement, un plasma peu coagulable peut correspondre à un sérum très coagulant, comme chez le crapaud (*Bufo marinus*); il arrive même, et c'est le cas chez ce

dernier animal, qu'un sérum ne coagule que peu ou pas le plasma de la même espèce et agisse de mode beaucoup plus énergique sur le plasma plus coagulable d'une espèce zoologique très éloignée, de cheval par exemple.

Voici quelques exemples montrant les variations respectives du pouvoir coagulant du sérum et de la coagulabilité du plasma chez diverses espèces animales :

Cheval 57.	Pouvoir coagulant du sérum sur le plasma étalon fluoré de cheval : 0,30.
	Coagulabilité du plasma fluoré par le sérum étalon de cheval : 0,35.
Chien 2.	Pouvoir coagulant du sérum sur le plasma étalon fluoré de cheval : 1,5.
	Coagulabilité du plasma fluoré par le sérum étalon de cheval : 0,08.
<i>Bufo marinus</i> (crapaud).	Pouvoir coagulant du sérum sur le plasma étalon fluoré de cheval : 0,80.
	Pouvoir coagulant du sérum sur le plasma homologue fluoré : Ne coagule pas avec 1 cent. cube. Coagulabilité du plasma fluoré par le sérum étalon de cheval : Ne coagule pas avec 1 cent. cube. (Bain-marie 37° durant une heure.)

Chez le même sujet, sous l'influence de divers agents, ces deux facteurs peuvent aussi varier indépendamment l'un de l'autre, parfois dans un sens opposé.

La coagulation sanguine dépend ainsi des respectives variations du pouvoir coagulant du sérum et de la coagulabilité du plasma ; ces deux propriétés elles-mêmes ne sauraient se réduire simplement à l'action de la thrombine du sérum sur le fibrinogène du plasma et l'équation :

Thrombine + fibrinogène = fibrine (coagulation) n'est pas équivalente à : Pouvoir coagulant du sérum + coagulabilité du plasma = coagulation.

D'autres facteurs, très divers, peuvent exalter ou diminuer l'action des éléments physiologiques, généralement admis comme essentiels dans la coagulation, la présence par exemple de certains sels, dont le calcium presque indispensable à la formation de la thrombine aux dépens du sérozyme et du cytozyme, des acides gras, des lipoïdes, la concentration et la réaction du milieu ; Vosburgh et Richards [1] ont les premiers montré l'influence de l'adrénaline sur la vitesse de coagulation du

sang, confirmée depuis par Cannon et ses collaborateurs Men-denhall et H. Gray [2] et d'autres physiologistes ; les travaux de Delezenne [3], de Howell [4], de Camus et Gley [40], de Billard [7], de Cannon et de nombreux autres biologistes, mais surtout de Doyon [5], ont mis en évidence l'existence dans le plasma circulant normal de substances anticoagulantes, appelées antithrombine (Doyon), héparine (Howell), aux-quelles serait due la fluidité du sang dans les vaisseaux et dont les variations joueraient un rôle essentiel, souvent plus important que celles de la thrombine dans les modifications de la coagulabilité du sang.

Pour étudier le phénomène de la coagulation sanguine, on a proposé de nombreuses méthodes de dosages de ses différents éléments, sérozyme, cytozyme, thrombine, fibrine, fibrinogène, antithrombine ; ces techniques sont toutes très délicates et très longues et n'offrent qu'une précision relative, ne pouvant pas tenir compte de diverses circonstances secondaires qui peuvent cependant modifier considérablement le phénomène.

Nous avons donc préféré étudier plus simplement dans la série animale les propriétés du sérum et du plasma.

Technique.

La technique que nous avons adoptée dans cette étude est analogue à celle décrite à propos de l'action des venins sur la coagulation sanguine, et consiste à mesurer *in vitro*, dans des conditions expérimentales uniformes, l'action coagulante des sérums à étudier sur un plasma étalon de coagulabilité établie antérieurement, ou au contraire à déterminer la coagulabilité de différents plasmas avec un sérum étalon d'action coagulante connue ; seulement, après de nombreux dosages, nous avons préféré choisir comme indicateur, non le commencement de la coagulation comme avec les venins, où une action protéolytique peut se superposer à l'action coagulante, mais la coagulation totale du plasma.

Voici la marche suivie :

Pour déterminer le pouvoir coagulant du sérum : Dans une série de tubes à hémolyse, de calibre rigoureusement égal, on

place des doses progressivement croissantes du sérum à étudier, complétant le volume à 1 cent. cube avec du sérum physiologique à 8 p. 1.000 (avec des sérum très peu coagulants, il est nécessaire d'employer des doses de sérum supérieures à 1 cent. cube); puis, après avoir ajouté à chaque tube 1 cent. cube de plasma étalon fluoré et avoir homogénéisé doucement le mélange, on place durant une heure au bain-marie à 37-38°, et l'on fait la lecture; *la plus petite dose du sérum à étudier capable de coaguler complètement en une heure 1 cent. cube du plasma étalon indique le pouvoir coagulant de ce sérum.*

La technique est exactement la même pour étudier la coagulabilité du plasma; seulement, au lieu d'employer un sérum inconnu et le plasma étalon, on détermine *la plus petite dose de sérum étalon capable de provoquer en une heure la coagulation totale de 1 cent. cube du plasma à étudier; on obtient ainsi l'indice de coagulabilité de ce plasma.*

Pour obtenir des résultats constants et comparables entre eux, il est nécessaire d'observer les mêmes règles que nous avons déjà indiquées à propos de l'étude des venins; le plasma et le sérum étalons provenant d'un seul animal, réservé uniquement pour ce service et dont la stabilité est vérifiée de temps à autre; sérum et plasmas doivent être du même jour, la coagulabilité du plasma augmentant, et le pouvoir coagulant du sérum diminuant rapidement après vingt-quatre heures, même en les conservant à la glacière :

Cheval n° 1.

22 juillet 1927 : Pouvoir coagulant du sérum trois heures après la saignée, 0 c. c. 50.

23 juillet 1927 : Pouvoir coagulant du sérum un jour après la saignée, 0 c. c. 51.

24 juillet 1927 : Pouvoir coagulant du sérum deux jours après la saignée, 0 c. c. 53.

25 juillet 1927 : Pouvoir coagulant du sérum trois jours après la saignée, 0 c. c. 55.

26 juillet 1927 : Pouvoir coagulant du sérum quatre jours après la saignée, 0 c. c. 65.

27 juillet 1927 : Pouvoir coagulant du sérum cinq jours après la saignée, 0 c. c. 80.

28 juillet 1927 : Pouvoir coagulant du sérum six jours après la saignée, 0 c. c. 85.

Cheval n° 27.

27 décembre 1926 : Coagulabilité du plasma par le sérum étalon trois heures après la saignée, 0 c. c. 45.

28 décembre 1926 : Coagulabilité du plasma par le sérum étalon un jour après la saignée, 0 c.c. 45.

29 décembre 1926 : Coagulabilité du plasma par le sérum étalon deux jours après la saignée : 0 c.c. 35.

30 décembre 1926 : Coagulabilité du plasma par le sérum étalon trois jours après la saignée, 0 c.c. 30.

31 décembre 1926 : Coagulabilité du plasma par le sérum étalon quatre jours après la saignée, 0 c.c. 25.

1^{er} janvier 1927 : Coagulabilité du plasma par le sérum étalon sept jours après la saignée, 0 c.c. 23.

(Sérum et plasmas conservés à la glacière à + 10°.)

Le sérum recueilli après séparation naturelle du caillot, généralement trois heures après la saignée, n'a pas montré de variations d'activité durant les vingt-quatre premières heures. L'augmentation de la coagulabilité du plasma avec le temps est comparable à celle déjà vérifiée avec les venins.

L'action pendant quelques minutes de températures voisines du point de coagulation, où l'action prolongée pendant quelques heures de températures entre 30 et 40°, entraîne une diminution rapide du pouvoir coagulant du sérum, qui est inactivé complètement après une heure à 58°.

Au moment de la saignée, il faut éviter avec soin le contact du sang avec les tissus ; sérum et plasmas doivent être privés par décantation ou centrifugation rapide de tout élément figuré.

En observant ces précautions, les résultats fournis par cette technique sont remarquablement constants et toujours comparables entre eux.

I. — Étude des sérum et plasmas normaux dans l'échelle zoologique.

SÉRUMS NORMAUX.

L'action coagulante du sérum normal est un fait bien établi depuis les travaux de A. Schmidt, qui le premier a isolé du sérum une substance coagulante, la thrombine ou fibrin-ferment ; mais l'intensité de cette action coagulante, ses variations spécifiques ou individuelles n'ont fait l'objet que de courtes références dans la littérature.

Les techniques proposées pour cette étude reposent presque toutes sur le dosage de la thrombine extraite du sérum, ou de son élément principal, le sérozyme, extrait du plasma; les réactifs employés sont très variables, plasmas dilués ou chlorurés, oxalatés ou fluorés, ou plasmas d'oiseaux naturellement peu coagulables, liquide d'ascite ou d'hydrocèle, ou solutions de fibrinogène artificiellement préparées. Les résultats obtenus dans ces conditions si diverses ne sont naturellement valables que pour chaque expérience et nullement comparables entre eux. Ces travaux ne s'occupent d'ailleurs pas de déterminer la valeur coagulante de différents sérum, mais visent surtout à étudier le côté théorique de la question, nature et origine de la thrombine et le mécanisme de son action sur le fibrinogène, ou encore cherchent à déterminer les variations relatives de la thrombine chez un animal sous diverses influences.

Dans tous ces travaux existent naturellement des références aux différences d'activité du pouvoir coagulant du sérum chez différentes espèces; les sérum de cobaye, de chien, de même que celui des oiseaux sont, par exemple, considérés comme peu coagulants. Enfin, quelques auteurs ont étudié l'ensemble de la coagulation sanguine chez divers groupes zoologiques inférieurs, Nolf [6] chez les poissons, Argaud et Billard [7] chez *Vipera aspis*, Cuénot [8] chez les invertébrés.

DIVISION DES SÉRUMS NORMAUX. — D'après leur action sur le plasma, nous avons pu diviser les sérum normaux en trois groupes :

Sérum coagulants. — Presque tous les sérum de mammifères, d'oiseaux, de batraciens, de quelques reptiles possèdent une action coagulante plus ou moins marquée sur le plasma; certains sont très actifs, comme ceux du cheval ou du bœuf, d'autres possèdent une action à peine marquée (homme, chien, chat); entre ces points extrêmes, existent toute une série d'intermédiaires, sans qu'il y ait de relation directe entre la position plus ou moins élevée des espèces dans l'échelle zoologique et l'activité de leur sérum.

Sérum inactifs. — Un très petit nombre de sérum sont complètement inactifs, ne coagulant pas à doses très élevées des plasmas même très coagulables mais n'exerçant pas non

plus d'action inhibitrice sensible sur la coagulation du plasma par un sérum actif; nous avons rencontré normalement de tels sérum dans les groupes les plus divers, chez le cobaye, le poulet, le *Crotalus terrificus*, les arachnides et, exceptionnellement au cours de certains états pathologiques, chez le cheval et l'homme.

Voici un de nos protocoles avec le sérum de cobaye :

**Action du sérum de cobaye sur la coagulation normale
(cobaye n° 7, mâle).**

NOMBRE DU TUBE	SÉRUM DE COBAYE (en cent. cubes)	SÉRUM ÉTALON (en cent. cubes)	PLASMA ÉTALON (en cent. cubes)	LECTURE			
				15 minutes	30 minutes	45 minutes	60 minutes
Témoin 1	1	1	1	0	0	0	0
Témoin 2	—	—	—	++	+++	++++	++++
1	1	1	1	++	+++	++++	++++
2	0,75	1	1	++	+++	++++	++++
3	0,50	1	1	++	+++	++++	++++
4	0,25	1	1	++	+++	++++	++++
5	0,40	1	1	++	+++	++++	++++

Observations. — Le volume dans tous les tubes est complété à 3 cent. cubes avec du sérum physiologique à 8 p. 1.000. Bain-marie 37°.

Sérum anticoagulants. — L'existence de sérum inhibiteurs de la coagulation normale est un fait des plus importants au point de vue de la théorie du mécanisme de la coagulation. A. Mosso [9] et Delezenne [3] avaient déjà observé que le sérum d'anguille injecté à des animaux en rendait le sang incoagulable, fait que le dernier auteur attribuait à la mise en liberté en grande abondance par le foie, sous l'influence de ce sérum toxique, d'une substance anticoagulante. Camus [13] et Bordet et Gengou avaient obtenu également chez le cobaye un sérum anticoagulant *in vitro* à la suite d'injections de sérum de lapin.

Houssay, Sordelli et Negrete [11] ont soupçonné l'action inhibitrice *in vitro* du sérum de serpents sans étudier ce phénomène.

Nous avons d'abord vérifié l'action anticoagulante du sérum

de plusieurs espèces d'ophidiens dont certains, comme celui de *Lachesis lanceolatus*, sont très actifs, l'addition de 0 c. c. 2 de sérum à 1 cent. cube de plasma étalon empêchant ce dernier de coaguler pendant plusieurs heures avec 1 cent. cube de sérum étalon; en dehors des ophidiens, nous n'avons rencontré qu'exceptionnellement des sérum inhibiteurs, et toujours à un degré beaucoup plus faible, chez le cobaye par exemple et chez des sérum humains pathologiques; enfin, certains sérum coagulants, chauffés plusieurs fois à 55°, peuvent devenir légèrement inhibiteurs.

**Action inhibitrice du sérum de *Lachesis lanceolatus*
sur la coagulation normale.**

NOMBRE DU TUBE	SÉRUM de <i>L. lanceolatus</i> (en cent. cubes)	SÉRUM ÉTALON (en cent. cubes)	PLASMA ÉTALON (en cent. cubes)	LECTURE			
				15 minutes	30 minutes	45 minutes	60 minutes
Témoin 1	1	1	1	0	0	0	0
Témoin 2	—	1	1	++	++	+++	++++
1	1	1	1	0	0	0	0
2	0,75	1	1	0	0	0	0
3	0,50	1	1	0	0	0	0
4	0,25	1	1	0	0	0	0
5*	0,10	1	1	+	+	++	++

Observations. — Le volume dans tous les tubes est complété à 3 cent. cubes avec du sérum physiologique à 8 p. 1.000. Bain-marie 37°.

Cette action inhibitrice du sérum sur la coagulation normale est due à la présence de substances anticoagulantes, existant préformées dans le plasma et dont une partie seulement passe dans le sérum après la rétraction du caillot. L'étude du plasma nous permettra de mieux préciser leur rôle et leur origine. Nous nous limiterons à signaler maintenant que l'action inhibitrice du sérum des ophidiens venimeux est indépendante de la présence, dans le sérum de ces animaux, d'une antithrombine spécifique contre les coagulines de leurs propres venins; le sérum de *L. atrox*, le plus riche en anticoagulines spécifiques, ne possède qu'une action inhibitrice faible sur la coagulation normale; certaines espèces venimeuses possèdent un sérum

	NOMBRE DU TUBE	LECTURE			
		SÉRUM	SÉRUM INACTIVÉ du cheval n° 1 (en cent. cubes)	SÉRUM ÉTALON (en cent. cubes)	PLASMA ÉTALON (en cent. cubes)
Témoin 1.	1	1	1	1	1
Témoin 2.	1	1	1	1	1
1	1	1	1	1	1
2	0,75	0,75	0,75	0,75	0,75
3	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50
Témoin 3.	1	1	1	1	1
Témoin 4.	1	1 (non inactivé).	1	1	1
1	1	1	1	1	1
2	0,75	0,75	0,75	0,75	0,75
3	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50
4	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25
Témoin 5.	1	1	1	1	1
1	1	1	1	1	1
2	0,75	0,75	0,75	0,75	0,75

Observations. — Le volume de tous les tubes est complété à 3 cent. cubes avec du sérum physiologique à 8 p. 1.000. Bain-marie 37°.

inactif, tandis que le sérum d'espèces non venimeuses peut posséder des propriétés inhibitrices marquées; il ne s'agit donc pas d'une action para-spécifique des anticorps naturels du sérum des ophidiens venimeux.

Cette action anticoagulante doit être rattachée aux anticoagulines, existant normalement en plus ou moins grande abondance dans tous les sérums et dont les variations sont mal connues; on comprend alors que certains sérums, ordinaire-

ment très peu coagulants ou inactifs, puissent, en certaines circonstances, devenir légèrement inhibiteurs et que des sérum coagulants, après inactivation, présentent parfois une action anticoagulante marquée, fait confirmant les travaux de Doyon, de Howell et d'autres biologistes qui ont signalé que l'antithrombine normale résiste à 100°; enfin, certains sérum, très pauvres en éléments coagulants, peuvent présenter normalement un grand excès de ces anticoagulines et ainsi se trouve réalisé le type des sérum anticoagulants des ophidiens.

Le tableau précédent montre l'action inhibitrice légère d'un sérum normal de cobaye et celle d'un sérum de cheval inactivé; comme témoin nous avons pris un sérum peu coagulant de lapin, qui a cependant accéléré la coagulation normale du plasma étalon par le sérum étalon.

PLASMAS NORMAUX.

La coagulabilité du plasma a été plus étudiée que le pouvoir coagulant du sérum, mais les procédés employés diffèrent également beaucoup entre eux.

Quelques auteurs n'ont pas distingué la coagulabilité du plasma du phénomène plus complexe de la coagulation du sang et ont mesuré la vitesse de coagulation de ce dernier, fait différent de celui qui nous intéresse et dans lequel interviennent non seulement les agents coagulants normaux du sang, mais encore toutes les conditions expérimentales, telles que le contact des tissus et des corps étrangers.

La coagulabilité du plasma a généralement été étudiée en partant de plasmas artificiellement stabilisés, citratés, oxalatés ou sulfatés, ou obtenus en rendant le sang incoagulable *in vivo* par injection aux animaux de peptone, d'hirudine ou de sels de zinc. Arthus, le premier, a proposé d'utiliser les propriétés remarquables du plasma fluoré pour étudier quantitativement le fibrinogène; Morawitz [17] a utilisé dans le même but le plasma oxalaté et Bordet [12] dans ses travaux sur la coagulation s'est servi surtout de plasmas salés.

L'emploi de plasmas purs de mammifères, recueillis en tubes paraffinés et refroidis, est difficile par suite de leur

instabilité, tandis que ceux des vertébrés ovipares, préparés dans les mêmes conditions, se conservent fluides assez longtemps.

L'un des principaux procédés pour l'étude de la coagulabilité du plasma est basé sur le dosage de son élément actif, le fibrinogène, précipité soit par la chaleur (méthode de Whipple), soit par divers réactifs chimiques, sulfate d'ammonium (méthode de Reye) ou acide acétique (Doyon-Morel) ou par simple dilution du plasma chloruré (Bordet). Ces procédés sont très délicats, étant donné la difficulté de précipiter tout le fibrinogène à l'exclusion des protéides, et est incomplet, ne tenant compte que d'un seul des éléments du plasma, le fibrinogène, négligeant les autres facteurs pouvant influencer le phénomène.

C'est pourquoi d'autres biologistes préfèrent peser directement la fibrine obtenue soit après recalcification du plasma oxalaté ou citraté (Gram [44]; Zunz [45]), soit du caillot, soigneusement lavé, formé par le sang recueilli au sortir de la veine dans de l'eau distillée (Doyon-Morel).

La mesure de la vitesse de coagulation du plasma décalcifié après addition de chlorure de calcium ne donne que des résultats inconstants et ne peut être employée que pour vérifier les variations relatives de coagulabilité du plasma au cours d'une même expérience.

Des méthodes aussi différentes, tant par le but visé que par leurs conditions expérimentales ne permettent pas de comparer leurs résultats, qui diffèrent beaucoup de l'une à l'autre; ainsi les chiffres fournis par le dosage du fibrinogène sont généralement trop forts et ne correspondent pas à ceux donnés par le dosage de la fibrine avec le même plasma; chacune de ces techniques n'envisage qu'une des faces du problème et non proprement la coagulabilité du plasma qui nécessiterait l'emploi combiné de diverses méthodes.

De l'ensemble de ces travaux, on peut seulement conclure que le plasma des mammifères est très coagulable et que les variations spécifiques et individuelles sont très grandes. Zunz et Jean La Barre [46] ont trouvé chez des chiens normaux, en dosant la fibrine, des variations de 140 à 503 milligrammes pour 100 cent. cubes de plasma. Le plasma des oiseaux est

beaucoup moins coagulable et cette stabilité a été attribuée, au moins en partie, par divers auteurs, tels Jouan et Staub et Mellamby, à sa grande alcalinité; de même les plasmas de poissons, de batraciens et de reptiles ne coagulent que lentement, celui de *Vipera aspis* exigeant plusieurs heures à la température du laboratoire (Argaud et Billard).

PLASMAS COAGULABLES. — Nos nombreuses recherches sur la coagulabilité du plasma dans la série zoologique nous ont montré que tous les plasmas de mammifères étudiés, et certains plasmas d'oiseaux et de reptiles sont coagulables à des degrés divers sous l'action du sérum étalon, tandis que certains plasmas d'oiseaux et de sauriens et tous ceux d'ophidiens et de batraciens ne coagulent pas, même avec des doses élevées, 2 cent. cubes à 3 cent. cubes de ce sérum.

SUBSTANCES ANTICOAGULANTES DU PLASMA. — Dans nos premières communications, nous avions été portés à attribuer le manque de coagulabilité de ces plasmas à leur pauvreté en fibrinogène. Cette interprétation s'accordait mal avec divers faits observés postérieurement : le plasma des animaux, qui n'est coagulable ni par le sérum étalon ni par leur propre sérum, coagule cependant lorsqu'il est mis en contact avec des tissus ou des sucs tissulaires; de même, si le plasma des ophidiens venimeux est relativement résistant à l'action coagulante des venins, celui des autres reptiles, des oiseaux et des batraciens est sensible aux venins de *Lachesis*; ces faits montrent que le fibrinogène existe dans de tels plasmas en quantité suffisante pour en déterminer la coagulation sous certaines influences et créent une certaine analogie entre ces plasmas normalement inactifs et ceux obtenus du sang peptoné.

Nous avons été ainsi conduits à nous demander si le manque de sensibilité de ces plasmas à l'action des sérum ne serait pas dû à la présence normale de substances anticoagulantes, véritables antithrombines spécifiques, semblables à celles mises en évidence par plusieurs auteurs dans le sang de certains animaux à la suite de l'injection de divers agents.

La technique employée pour vérifier cette hypothèse a été celle décrite à propos des venins anticoagulants et consiste à

mélanger *in vitro* des doses croissantes du plasma à étudier à 1 cent. cube du sérum étalon, puis à ajouter 1 cent. cube du plasma étalon.

Avec cette technique, *tous les plasmas non coagulables par le sérum étalon se sont montrés inhibiteurs de la coagulation normale*; certains ont une action très puissante, agissant déjà à la dose de 0 c. c. 2.

La coagulation est simplement suspendue, sans qu'il y ait destruction de ses éléments actifs, et tend à se produire lentement, quelquefois en vingt-quatre ou quarante-huit heures seulement, suivant l'activité et la dose du plasma inhibiteur employée.

**Action inhibitrice du plasma de poulet
sur la coagulation normale.**

NUMÉRO DU TUBE	PLASMA de poulet (en cent. cubes)	SÉRUM ÉTALON (en cent. cubes)	PLASMA ÉTALON (en cent. cubes)	LECTURE			
				15 minutes	30 minutes	45 minutes	60 minutes
Témoin 1 . . .	1	1	1	+++	++++	++++	++++
Témoin 2 . . .	1	1	1	0	0	0	0
Témoin 3 . . .	1	2	1	0	0	0	8
1	0,1	1	1	+++	++++	++++	++++
2	0,2	1	1	++	++	++	++
3	0,3	1	1	0	+	+	++
4	0,4	1	1	0	0	0	+
5	0,5	1	1	0	0	0	0
6	0,6	1	1	0	0	0	0
7	0,8	1	1	0	0	0	0
8	1,0	1	1	0	0	0	0

Observations. — Le volume de tous les tubes complété à 3 cent. cubes avec du sérum physiologique à 8 p. 1.000. Bain-marie 37°.

Le plasma de poulet à la dose de 0 c. c. est inhibiteur de la coagulation normale.

C'est donc bien à la présence dans le plasma circulant de grandes quantités de substances anticoagulantes, et non à une teneur très faible en fibrinogène qu'il faut attribuer la non coagulabilité de ces plasmas par les agents coagulants du sérum.

Les plasmas faiblement coagulables peuvent exercer également une action analogue, mais beaucoup plus faible sur des

doses de sérum étalon, inférieures à celles nécessaires pour les coaguler eux-mêmes. Cette action retardante est très nette avec le plasma de gamba (*Didelphis aurita* — ordre des *marsupiaux*) :

NOMBRE DU TUBE	PLASMA de <i>D. aurita</i> (en cent. cubes)	SÉRUM ÉTALON (en cent. cubes)	PLASMA ÉTALON (en cent. cubes)	LECTURE			
				15 minutes	30 minutes	45 minutes	60 minutes
Témoin 1	—	1	1	++	+++	+++	++++
Témoin 2	1	1	0	0	0	0	0
Témoin 3	1	2	—	—	—	—	—
1	0,1	1	1	++	++	++	++
2	0,2	1	1	++	++	++	++
3	0,4	1	1	++	++	++	++
4	0,6	1	1	++	++	++	++
5	0,8	1	1	++	++	++	++
6	1,0	1	0	+	+	++	+++

Observations. — Le volume de tous les tubes est complété à 3 cent. cubes avec du sérum physiologique à 8 p. 1.000. Bain-marie 37°.

De l'ensemble de ces faits, il ressort que :

La coagulabilité normale du plasma dépend de deux facteurs : richesse en fibrinogène et sa teneur en substances anticoagulantes dont la présence à l'état libre paraît constante dans tous les plasmas, et qui concourent ainsi à maintenir la fluidité du sang, confirmant et amplifiant même les idées de Doyon; peu abondantes à l'état normal dans certains plasmas très coagulables, comme ceux des mammifères supérieurs, elles peuvent augmenter considérablement sous l'action de diverses substances ou à l'état pathologique; enfin, chez d'autres espèces, surtout des vertébrés inférieurs, elles existent normalement en grande quantité, d'où la résistance de ces plasmas à l'action coagulante des sérum.

Après la coagulation du sang, ces substances anticoagulantes se retrouvent dans le sérum où leur action est toujours moins nette, masquée totalement dans les sérum très riches en thrombine, en partie seulement dans les autres, réalisant ainsi les différents types de sérum, coagulants inactifs ou anticoagulants dont nous avons parlé.

RELATIONS ENTRE LE POUVOIR COAGULANT DU SÉRUM
ET LA COAGULABILITÉ DU PLASMA.

SPÉCIFICITÉ DES ÉLÉMENTS DE LA COAGULATION SANGUINE. — La coagulabilité du fibrinogène apparaît comme un phénomène général, dépourvu de toute spécificité, déterminé par les agents les plus divers, sérum, extraits de tissus, venins, substances chimiques, ou même des facteurs physiques, tels qu'une forte agitation.

L'action de la thrombine est au contraire un phénomène électif, ne s'exerçant que sur le fibrinogène.

L'action des substances anticoagulantes, ou antithrombines normales, est également élective, ne s'exerçant que sur la thrombine du sérum; il en est de même pour les anticoagulines spécifiques contre l'action coagulante des venins, soit naturelles, soit acquises, qui n'agissent que sur les venins correspondants, expliquant l'absence totale de parallélisme que nous avons déjà signalée entre la coagulabilité normale d'un plasma et sa coagulabilité par les venins. Les quelques exemples suivants sont très démonstratifs à ce sujet :

PLASMA DE	ACTION INHIBITRICE sur la coagulation normale (en cent. cubes)	COAGULABILITÉ par le venin de <i>L. lanceolatus</i> (en milligrammes)
		COAGULABILITÉ du plasma par le sérum étalon (en cent. cubes)
<i>Crotalus terrificus</i>	0,1	0,5
<i>Lachesis lanceolatus</i>	0,25	Ne coagule pas avec 10.
<i>Drymobius bifossatus</i>	0,30	0,6
<i>Alligator sp.</i> ?	0,20	0,01
<i>Bufo marinus</i>	0,40	0,1
<i>Gallus domesticus</i>	0,50	0,005
COAGULABILITÉ du plasma par le sérum étalon (en cent. cubes)		
<i>Tupinambis nigropunctatus</i>	2	0,001
<i>Didelphis aurita</i>	1,5	2,5
<i>Dasypus sp.</i> ?	2,5	0,0002
<i>Lepus cuniculus</i>	0,33	0,0001
<i>Equus caballus</i>	0,31	0,0002

Observations. — Lecture en une heure, bain-marie 37°. Ces deux dosages ont été réalisés avec le plasma du même exemplaire de chaque espèce.

Mais si l'action de la thrombine et des antithrombines normales ne s'exerce que sur le fibrinogène, cette réaction n'est pas spécifique au sens propre du mot; la coagulabilité du plasma par un sérum dépend uniquement des variations respectives de leurs éléments coagulants et anticoagulants, indépendamment des relations de parenté zoologique entre le sérum et le plasma; c'est ce que nous avons eu souvent l'occasion de vérifier au cours de ces recherches, de nombreux plasmas étant moins coagulables par le sérum homologue que par le sérum d'espèces zoologiquement très éloignées beaucoup plus riches en éléments coagulants; en voici quelques exemples :

PLASMA DE	COAGULABILITÉ par le sérum homologue (en cent. cubes)	COAGULABILITÉ par le sérum étalon (en cent. cubes)
<i>Lepus cuniculus</i>	4	0,27
<i>Canis vetus</i>	1,2	0,15
<i>Ovis aries</i>	0,45	0,13
<i>Dasipus</i> sp. ?	Ne coagule pas avec 2.	1,0
<i>Didelphis aurita</i>	Ne coagule pas avec 2.	1,5

Observations. — Lecture en une heure, bain-marie 37°. Le plasma et le sérum d'un seul exemplaire de chaque espèce ont servi pour les deux dosages.

De même un sérum peut être actif sur le plasma homologue très riche en antithrombines naturelles, et beaucoup plus coagulant pour le plasma d'une autre espèce plus sensible :

SÉRUM DE	POUVOIR COAGULANT sur le plasma homologue (en cent. cubes)	POUVOIR COAGULANT sur le plasma étalon (en cent. cubes)
<i>Tupinambis nigrapunctatus</i>	1	0,65
<i>Bufo marinus</i>	Ne coagule pas avec 1,5.	0,75
<i>Gallus domesticus</i>	Ne coagule pas avec 1,5.	1,0
<i>Didelphis aurita</i>	Ne coagule pas avec 1,5.	0,85

Observations. — Lecture en une heure, bain-marie 37°. Le plasma et le sérum d'un seul exemplaire de chaque espèce ont servi pour les deux dosages.

RAPPORTS ENTRE LE POUVOIR COAGULANT DU SÉRUM ET LA COAGULABILITÉ DU PLASMA DANS L'ÉCHELLE ZOOLOGIQUE. — L'étude comparée

du sérum et du plasma dans toute l'échelle zoologique ne montre aucune relation régulière entre ces deux propriétés, qui peuvent varier toutes les deux indépendamment l'une de l'autre; chez les mammifères cependant, il existe souvent un certain équilibre entre le pouvoir coagulant du sérum et la coagulabilité du plasma, un plasma très coagulable correspondant chez de nombreuses espèces à un sérum peu coagulant, et inversement, mais cette règle est loin d'être constante (tableau I).

Chez les vertébrés inférieurs, certains oiseaux, les reptiles et les batraciens, un sérum faiblement coagulant, inactif ou anticoagulant, accompagne un plasma peu coagulable ou franchement inhibiteur; ces caractères si particuliers expliquent la très faible coagulabilité spontanée du sang de ces animaux, qui retiré des vaisseaux à l'abri du contact des tissus et centrifugé pour en séparer les éléments figurés, ou même sans cette dernière précaution avec le sang de certains ophidiens très riche en antithrombines naturelles, se conserve fluide très longtemps, tandis que le sang des mammifères recueilli avec de grandes précautions, en tubes paraffinés et refroidis, et centrifugé de suite, se coagule rapidement. Chez les premiers, la coagulation exige normalement pour s'opérer l'intervention active de substances étrangères coagulantes, sucs de tissus ou autres; le sang des seconds contient, au contraire, tous les éléments nécessaires à la coagulation qui n'a besoin que d'être catalysée ou activée par une modification physique ou chimique du milieu pour se produire avec une grande intensité. Ces constatations sont intéressantes à rapprocher des théories récentes sur la pluralité des processus de la coagulation sanguine normale, dont les partisans avec Mills et Mathews [18] admettent également deux processus distincts, l'un tirant tout du propre sang, l'autre dû à l'action des sucs tissulaires, et qui d'ailleurs peuvent se compléter l'un et l'autre. D'après nos expériences, chez les vertébrés inférieurs le second processus serait le seul existant, tandis que chez les mammifères les deux mécanismes coexisteraient, l'un ou l'autre prédominant suivant les conditions expérimentales.

**ÉTUDE DU SÉRUM ET DU PLASMA
DANS LES PRINCIPAUX GROUPES ZOOLOGIQUES.**

Nous avons étudié les caractères du sérum et du plasma dans les principaux groupes zoologiques, arthropodes, batraciens, reptiles, oiseaux et mammifères, examinant, autant que possible, le sérum et le plasma d'un certain nombre d'animaux des deux sexes de chaque espèce afin de pouvoir établir des moyennes spécifiques; les variations individuelles, avec des animaux sains, peuvent être assez sensibles, mais restent toujours dans certaines limites permettant l'établissement de moyennes suffisamment exactes. Les animaux présentant des troubles pathologiques ou utilisés antérieurement pour l'immunisation ou d'autres expériences ne peuvent servir pour ces recherches. Le sexe ne paraît pas avoir d'influence régulière non plus que l'âge, sur l'activité du sérum et du plasma.

**Variations du pouvoir coagulant du sérum
et de la coagulabilité du plasma dans l'espèce bovine,
en relation avec l'âge et le sexe.**

SEXE	AGE	POUVOIR COAGULANT (en cent. cubes)	COAGULABILITÉ (en cent. cubes)
Veau	1 mois.	0,55	0,30
Veau	1 mois.	0,80	0,28
Veau 31	1 an.	0,60	0,35
Veau 32	1 an.	0,79	0,30
Bœuf.	3 ans.	0,80	0,35
Bœuf.	3 ans,	0,80	0,26
Bœuf.	3 ans.	0,73	0,28
Bœuf.	3 ans.	0,40	0,32
Génisse	1 mois.	0,80	0,28
Génisse	8 mois.	0,85	0,40
Vache	Adulte.	0,70	0,30
Vache	Adulte.	0,55	0,28

Observations. — Lecture en une heure. Bain-marie 37°.

Le pouvoir coagulant du sérum et la coagulabilité du plasma chez un individu normal sont remarquablement constants, comme nous avons pu le vérifier par des dosages répétés à inter-

valles réguliers pendant deux ans chez divers animaux (cheval, mouton, chien).

8 juin 1925 : Pouvoir coagulant du sérum du cheval n° 1, 0 c. c. 55.
 20 octobre 1925 : Pouvoir coagu'ant du sérum du cheval n° 1, 0 c. c. 51.
 7 mai 1926 : Pouvoir coagulant du sérum du cheval n° 1, 0 c. c. 53.
 24 novembre 1926 : Pouvoir coagulant du sérum du cheval n° 1, 0 c. c. 55.
 22 juillet 1927 : Pouvoir coagulant du sérum du cheval n° 1, 0 c. c. 50.

MAMMIFÈRES. — Suivant les groupes, les propriétés du sérum et du plasma des mammifères sont très variables. Généralement, par suite de sa faible teneur en antithrombines à l'état normal, le plasma est très coagulable, sauf dans quelques groupes inférieurs, édentés et marsupiaux ; le sérum peut, au contraire, être très coagulant, peu coagulant, inactif ou légèrement inhibiteur. Nous avons déjà signalé l'existence, chez un certain nombre d'espèces, d'un rapport inverse entre l'activité du sérum et du plasma, surtout notable chez le cobaye, l'agouti, le porc, l'homme, le chat et d'autres espèces voisines (tableau I). Il n'y a pas de relation entre les propriétés du sérum et du plasma et la position plus ou moins élevée des espèces dans l'échelle zoologique ; mais chez les espèces d'un même groupe, le sérum et le plasma présentent des caractères assez uniformes.

HOMME. — Les propriétés du sérum humain sont délicates à fixer par suite de la difficulté de rencontrer un sang humain complètement normal ; nous avons dû considérer comme tel, tout sang présentant une réaction de Wassermann négative en l'absence d'état pathologique apparent.

Le sérum est très peu coagulant ; le chiffre moyen, obtenu de 80 dosages, a été entre 0 c. c. 8 et 0 c. c. 9 pour le commencement de l'action coagulante ; 4 sérum seulement ont commencé à coaguler le plasma étalon avec 0 c. c. 6, et 6 se sont montrés inactifs à la dose de 1 c. c. 2 ; la coagulation totale est difficile à déterminer à cause de la nécessité d'employer un volume beaucoup plus grand de sérum venant modifier la réaction ; la moyenne a été de 1 c. c. 5. Le plasma est très coagulable et peu stable, même fluoré à 3 et 4 p. 1.000 ; la moyenne donnée par 10 dosages a été de 0 c. c. 10 (coagulation totale).

Nous n'avons pas pu étudier l'influence exercée par la race sur ces phénomènes, question qui mériterait cependant d'être approfondie.

CARNIVORES. — Chez les espèces étudiées, chien, renard (*Canis vetulus*), chat raton laveur (*Procyon cancrivorus*), le sérum est peu coagulant et le plasma très coagulable, moins celui du *Procyon cancrivorus*.

RONGEURS. — Le sérum est peu coagulant (lapin, agouti), inactif ou légèrement inhibiteur (cobaye); le plasma est très coagulable.

SUIDÉS. — Chez le porc, seule espèce étudiée, le sérum est peu coagulant et le plasma très coagulable.

RUMINANTS. — Le sérum est beaucoup plus coagulant que dans les groupes précédents et le plasma très coagulable.

ÉQUIDÉS. — Chez le cheval et le mulet, le sérum est plus coagulant que dans les autres groupes ; le plasma est moins coagulable.

ÉDENTÉS. — Le sérum est peu coagulant chez le paresseux (*Bradypus sp.*) et presque inactif chez différentes espèces de tatous ; le plasma des uns et des autres est peu coagulable.

MARSUPIAUX. — Le sérum de la sarigue ou gamba (*Didelphis aurita*) est coagulant et le plasma est peu coagulable.

OISEAUX. — Suivant les espèces, les propriétés du sérum et du plasma sont très variables ; chez le pigeon, la chouette (*Strix sp.*), le sérum est très coagulant et le plasma coagulable ; chez le poulet, le sérum est beaucoup moins coagulable et le plasma fortement inhibiteur.

REPTILES. — *Crocodiliens.* — Le sérum du crocodile est inactif ; son plasma fortement inhibiteur.

Sauriens. — Le sérum des lézards est faiblement coagulant et le plasma non coagulable.

TABLEAU I. — Variations du pouvoir coagulant du sérum et de la coagulabilité du plasma chez les mammifères.

NOM SPÉCIFIQUE	POUVOIR COAGULANT DU SÉRUM			COAGULABILITÉ DU PLASMA		
	Nombre d'échantillons examinés	Moyenne (en cent. cubes)	Variations extrêmes (en cent. cubes)	Nombre d'échantillons examinés	Moyenne (en cent. cubes)	Variations extrêmes (en cent. cubes)
Homme	80	0,85	0,6-1,20	40	0,40	0,05-0,45 (4)
Chien (<i>Canis familiaris</i>)	25	1,05	0,82-2,20	10	0,43	0,07-0,20
Renard (<i>Canis velutinus</i>)	4	1,40	1,20-1,60	4	0,15	0,10-0,20
Chat (<i>Felis domesticus</i>)	6	1,60	1,20->2	6	0,25	0,10-0,30
<i>Pracyon cancrivorus</i>	4	1,40	1,20-1,50	4	0,08-1,2	
Cobaye (<i>Cavia aperea</i>)	10	Inactif.	Traces 1,5, inhibiteur 5.	—	—	— (2)
Agouti (<i>Dasyprocta aguti</i>)	2	1,2	—	2	—	— (2)
Lapin (<i>Lepus caniculus</i>)	10	1,50	1,20-4,80	10	0,27	0,15-0,32
Porc (<i>Sus domesticus</i>)	2	1,10	1-1,20	2	—	— (2)
Bœuf (<i>Bos taurus</i>)	18	0,35	0,40-0,90	8	0,31	0,28-0,35
Mouton (<i>Ovis aries</i>)	12	0,61	0,52-0,70	6	0,42	0,40-0,44
Chèvre (<i>Capra hircus</i>)	5	0,81	0,62-0,92	2	0,40	0,08-0,12
Cheval (<i>Equus caballus</i>)	38	0,32	0,17-0,60	30	0,31	0,24-0,43
Mulet (<i>Eq. caballus</i>)	40	0,42	0,32-0,90	40	0,44	0,30-0,35
Taureau (<i>Bos taurus sp.</i>)	4	2,5	—	0	—	—
Taïou (<i>Dasypus sp.</i>)	> 2	—	> 2-Inactif.	5	1,8	1->2
Parcasseux (<i>Bradypus sp.</i>)	5	4	—	1	1,2	—
Sarigue ou Gamba (<i>Didelphis aurita</i>) .	8	1,20	0,95-2	4	1,5	1-2

(1) Commencement de coagulation.

(2) Plasma fluoté très instable.

TABLEAU II. — Étude du sérum et du plasma des vertébrés ovipares.

NOM SPÉCIFIQUE	SÉRUM			PLASMA		
	Nombre d'exemplaires	Moyenne		Nombre d'exemplaires	Moyenne	
		Sérum coagulant (en cent. cubes)	Sérum inhibiteur (en cent. cubes)		Plasma coagulant (en cent. cubes)	Plasma inhibiteur (en cent. cubes)
Pigeon (<i>Colomba domesticus</i>)	8	0,63	—	6	0,35	—
Poulet (<i>Gallus domesticus</i>)	5	1	—	5	—	0,50
Chouette (<i>Strix sp.</i>)	1	0,33	—	0	—	—
Lézard (<i>Tupinambis nigropunctatus</i>)	25	—	—	25	—	—
Amphisbène aïba.	5	—	—	—	—	—
Crocodile (<i>Alligator sp.</i>)	2	—	—	2	—	—
<i>Lachesis lanceolatus</i>	10	—	—	10	—	0,20
<i>Lachesis atrox</i>	5	—	—	5	—	0,35
<i>Lachesis Jararacucu</i>	10	—	—	10	—	—
<i>Lachesis alternatus</i>	10	—	—	10	—	—
<i>Lachesis cobara</i>	10	—	—	10	—	—
<i>Lachesis neumanni</i>	10	—	—	10	—	—
<i>Crotalus cerastes</i>	10	—	—	10	—	—
<i>Drymobiuss biocellatus</i>	5	—	—	10	—	0,10
<i>Crotalus cerastes</i>	1	—	—	5	—	0,30
<i>Constrictor constrictor</i>	3	—	—	0,80	0	—
<i>Bufo marinus</i>	30	0,80	—	1	0	—
<i>Lepidodactylus 5-dactylus</i>	40	0,70	—	30	—	0,40
Araignée (<i>Lycosa noctoria</i>)	30	—	—	10	0	0,80
Mygale (<i>Lasiodora curvirostris</i>)	3	—	—	0	—	—

(4) Commencement de coagulation du plasma avec 1 cent. cube.

Ophidiens. — Le sérum des ophidiens venimeux (*Crotaliniæ*), ou non venimeux (*Colubridæ aglyphes*, *Boidæ*), peut être anticoagulant ou inactif; le plasma de toutes les espèces examinées s'est montré inhibiteur à des degrés divers. Il n'y a pas de relation, comme nous l'avons vu, entre ces propriétés normales du sérum et du plasma et le caractère venimeux ou non de chaque espèce.

BATRACIENS. — Le sérum des batraciens est moyennement coagulant; le plasma est inhibiteur.

ARTHROPODES. — Le sérum des araignées, seul groupe étudié, est inactif; nous n'avons pu préparer le plasma fluoré pour en mesurer la coagulabilité; la coagulation du sang en contact avec les tissus se produit rapidement; *in vitro*, un léger flocon de fibrine se sépare du sérum.

Les tableaux I et II, ainsi que les graphiques ci-joints, résument nos recherches sur les propriétés normales du sérum et du plasma dans la série zoologique.

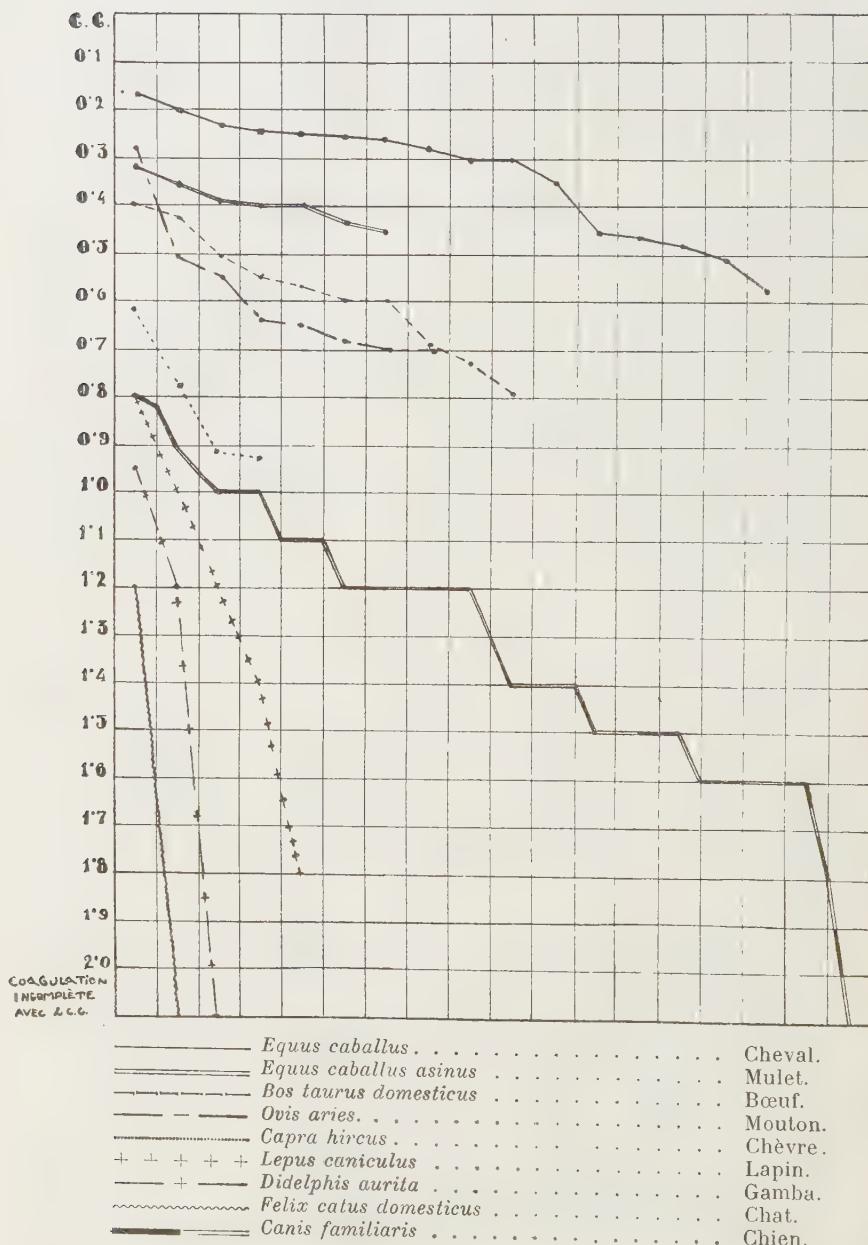
COMPARAISON ENTRE LES VARIATIONS SPÉCIFIQUES
DU POUVOIR COAGULANT
ET CELLES DES DIVERSES FRACTIONS PROTÉINIQUES DU SÉRUM.

Les résultats de l'étude du pouvoir coagulant du sérum dans la série zoologique sont, à côté d'autres faits, intéressants à comparer avec les variations de la richesse en protéines du sérum de diverses espèces animales étudiées par quelques auteurs.

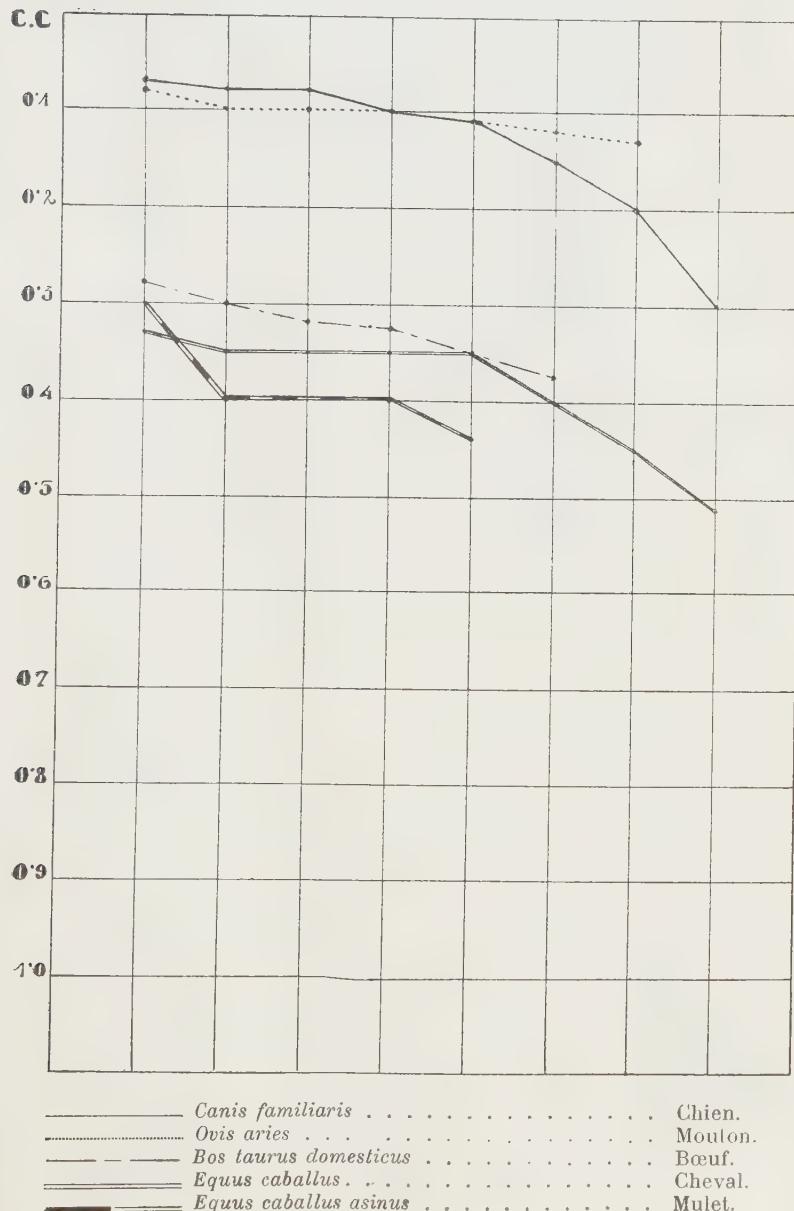
Les variations de composition et de concentration des protéines sanguines doivent exercer une influence notable dans un phénomène aussi complexe que celui de la coagulation, en modifiant l'équilibre physico-chimique du milieu, en dehors des relations pouvant exister entre certaines fractions protéiniques et quelques éléments essentiels de la coagulation, comme le fibrinogène, considéré par la plupart des auteurs comme une globuline ou un corps très voisin.

Les valeurs moyennes attribuées par différents biologistes aux principales fractions des protéines du sérum chez quelques

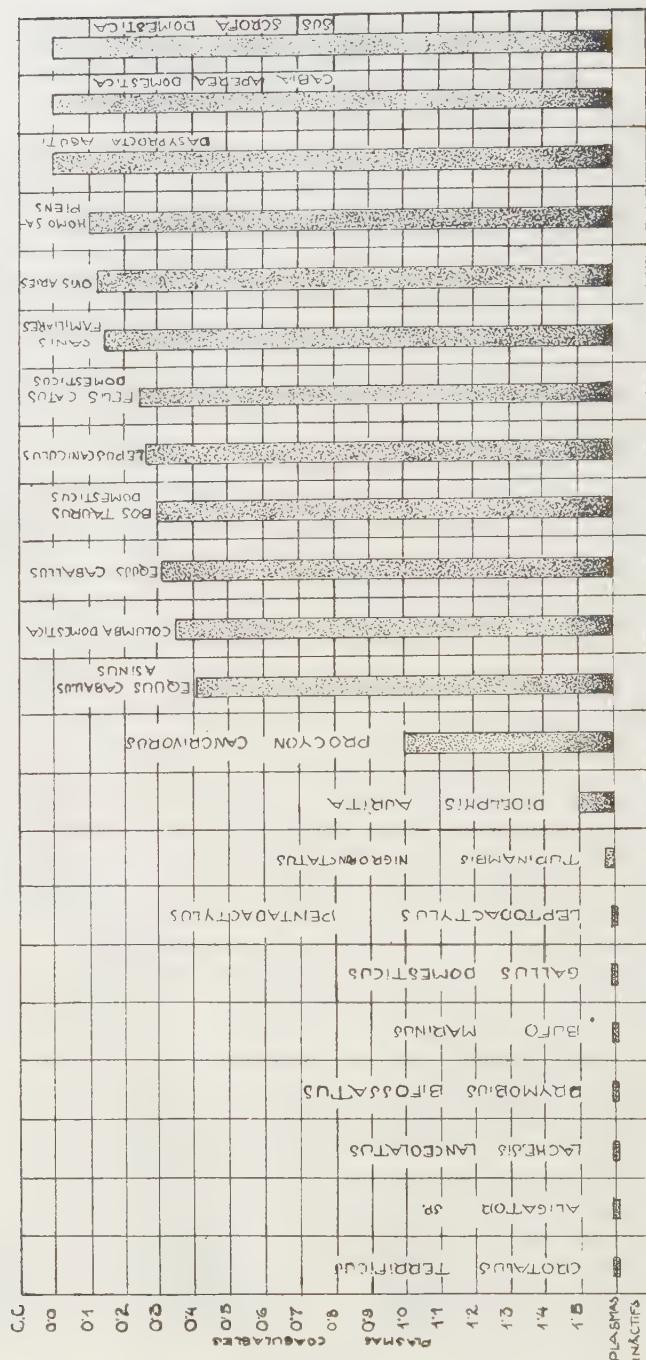
**Variations de l'action coagulante du sérum normal
chez une même espèce animale.
Comparaison du sérum de quelques espèces.**

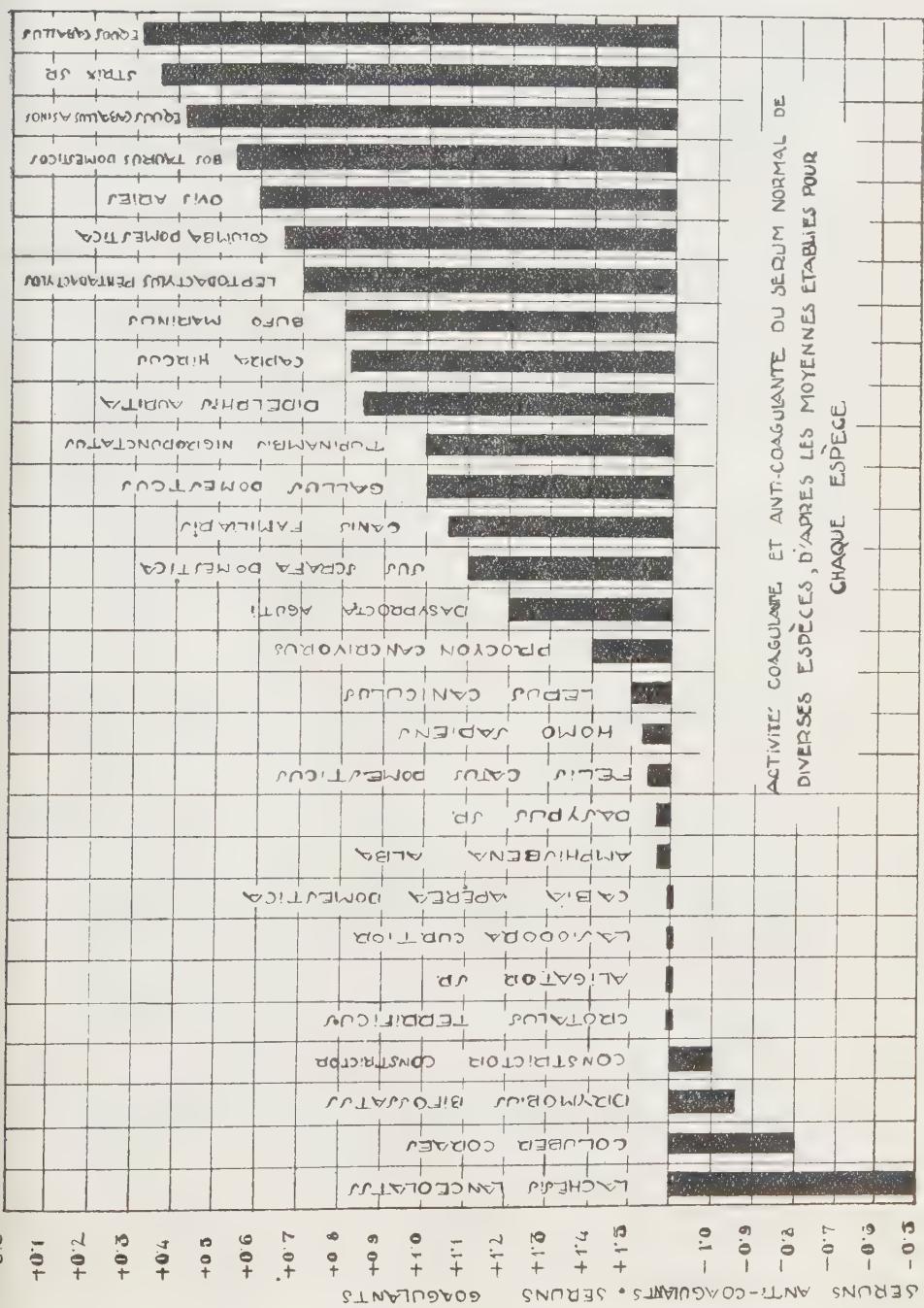


Variations de la coagulabilité du plasma normal
chez une même espèce animale.
Comparaison du plasma de quelques espèces.



Etude de la coagulabilité du plasma chez quelques espèces animales.





espèces animales à l'état normal sont généralement très voisines, au point que T. B. Robertson [19] a pu conclure à l'existence de caractéristiques spécifiques constantes de la composition chimique du sang.

Le tableau suivant permet de comparer le pouvoir coagulant du sérum mesuré par notre méthode avec les valeurs obtenues par Robertson, Hammarsten [20], Lewinski [21] et Iganaki [22] pour les globulines totales et les séro-albumines totales de quelques sérum :

ESPÈCES		D'APRÈS HAMMARSTEN	D'APRÈS ROBERTSON	D'APRÈS LEWINSKI	D'APRÈS IGANAKI	POUVOIR COAGULANT du sérum (en cent. cubes)
Cheval.	{ Globulines Séro-albumines	63 37	— —	63 37	— —	0,32
Boeuf.	{ Globulines Séro-albumines	58 42	— —	— —	— —	0,55
Lapin.	{ Globulines Séro-albumines	29 71	28 72	— —	29 74	1,3
Rat blanc.	{ Globulines Séro-albumines	— —	26 74	— —	— —	—

D'après ce tableau, il semble qu'il existe un certain rapport entre l'augmentation relative des globulines sur les séro-albumines et le pouvoir coagulant du sérum, les sérum très riches en globulines étant plus coagulants que les autres : mais ce rapprochement ne saurait être poussé plus loin; les variations individuelles, chez des sujets normaux, de la richesse en globulines sont par exemple beaucoup moins accusées que celles du pouvoir coagulant du sérum; les variations des diverses fractions protéïniques apparaissent ainsi comme de nombreux facteurs capables, mais à côté de beaucoup d'autres, d'influencer le phénomène si complexe de la coagulation sanguine et d'en modifier les conditions.

II. — Relations entre le pouvoir coagulant du sérum et la capacité de former des anticorps. Sélection des animaux destinés à la production de sérums antitoxiques par l'examen préalable du pouvoir coagulant du sérum.

Les nombreuses variations du pouvoir coagulant du sérum et de la coagulation du plasma observées entre individus de la même espèce, et que rien dans les antécédents des animaux ne permettait d'expliquer, nous ont conduit à étendre ces investigations et à examiner entre autres hypothèses, si de telles variations ne garderaient pas quelque relation avec les phénomènes d'immunité.

L'observation de variations dans un même sens de la richesse en globulines d'un sérum et du pouvoir coagulant de ce dernier ne pouvait que fortifier cette hypothèse. Depuis les travaux fondamentaux de Hiss et Atkinson [23], de Ledingham [24], de Seng et Joachin, de Gibson et Banzhaf [26-27], et de divers autres auteurs entre autres M. Piettre [25] à notre Institut, l'on sait le rôle important que jouent, dans les phénomènes d'immunité, certaines fractions des protéines sanguines, surtout les pseudo-globulines.

Laissant de côté le point de vue théorique de la question, sur lequel nos connaissances actuelles ne permettent que des hypothèses, nous avons recherché s'il ne serait pas possible, par l'examen préliminaire du pouvoir coagulant du sérum ou de la coagulabilité du plasma, de sélectionner les animaux destinés à l'immunisation.

C'est un fait, bien connu dans les Instituts de sérothérapie, qu'en prenant une grande série de chevaux, et en les immunisant tous pendant le même temps, dans les mêmes conditions, avec le même antigène, le sérum de quelques-uns d'entre eux atteint rapidement un pouvoir antitoxique très élevé, tandis que celui des autres ne possède qu'une valeur moyenne ou même insignifiante n'en permettant pas l'utilisation en thérapeutique. Il n'y a pas de doute que ces différences proviennent exclusivement des propres animaux soumis à l'immunisation.

De nombreux auteurs ont essayé d'établir la raison de ces

réponses individuelles si différentes à l'immunisation et de déterminer ce qui distingue un cheval bon producteur d'anticorps d'un cheval mauvais producteur. Les uns ont étudié spécialement les anticorps naturels dans le sérum ou le plasma, hémolysines, agglutinines, etc.; d'autres ont analysé chimiquement le sang de divers animaux neufs et immunisés, bons et mauvais producteurs, sous le rapport des protéines, des phosphatides, des graisses, ou de différents sels. L'unique fait qui paraît bien établi est l'élévation du taux de la pseudoglobuline pendant l'immunisation sans que les autres éléments organiques ou inorganiques du sérum paraissent subir des variations régulières, même chez un cheval exceptionnellement bon producteur d'antitoxine diphtérique (2.220 unités) de M. B. Kirkbride et P. P. Murdick [28].

Pour établir les relations possibles entre le pouvoir coagulant du sérum et la coagulabilité du plasma et la capacité de produire des anticorps, nous avons réalisé de nombreuses séries d'expériences, immunisant un grand nombre d'animaux avec divers antigènes, dosant le pouvoir coagulant du sérum et la coagulabilité du plasma de chaque animal avant, pendant et après l'immunisation et comparant les résultats obtenus avec le pouvoir antitoxique atteint par leur sérum.

Nous ne nous occuperons dans ce travail que de la sélection des animaux destinés à la production de sérums antidiphétique et antitétanique, réservant pour un autre mémoire l'étude des variations du pouvoir coagulant du sérum et de la coagulabilité du plasma au cours de l'immunisation avec d'autres antigènes.

Dans une première série d'expériences, réalisées à l'Institut de Butantan nous avons dosé le pouvoir coagulant du sérum de 11 chevaux, récemment reçus du haras de S. Paulo, n'ayant jamais servi dans un service d'immunisation, demandant ensuite à notre collègue le D^r Lemos Monteiro, chargé du service de la diphtérie, de bien vouloir les immuniser tous en même temps et dans les mêmes conditions avec la toxine diphtérique. Le tableau suivant indique la valeur du pouvoir coagulant du sérum avant l'immunisation et le dosage antitoxique final de ces animaux :

NUMÉRO du cheval	POUVOIR COAGULANT du sérum avant l'immunisation (en cent. cubes)	POUVOIR ANTITOXIQUE final
23	0,17	300 u. a.-t.
31	0,20	800 u. a.-t.
37	0,23	500 u. a.-t.
39	0,24	600 u. a.-t.
40	0,25	700 u. a.-t.
29	0,25	700 u. a.-t.
30	0,25	300 u. a.-t.
42	0,45	5 u. a.-t.
41	0,46	200 u. a.-t.
43	0,48	150 u. a.-t.
38	0,51	150 u. a.-t.

Ces résultats, sans indiquer une proportionnalité complète entre le pouvoir coagulant du sérum et la capacité de fournir des anticorps, montrent cependant une relation remarquable entre ces deux faits; ainsi dans cette série de 11 chevaux, choisis au hasard, nous trouvons 7 bons producteurs d'antitoxine dosant entre 300 et 800 unités et 4 mauvais, dosant entre 5 et 200 unités; or le pouvoir coagulant du sérum de bons producteurs varie entre 0 c. c. 17 et 0 c. c. 25, tandis que celui des mauvais est supérieur à 0 c. c. 45.

Comme contre-preuve de cette première expérience, nous avons séparé deux groupes de mulets n'ayant pas encore été

Premier groupe, immunisé avec la toxine diphtérique.

NUMÉRO des animaux	POUVOIR COAGULANT du sérum avant l'immunisation (en cent. cubes)	COAGULABILITÉ du plasma avant l'immunisation (en cent. cubes)	POUVOIR ANTITOXIQUE après l'immunisation
Mulet 67 . . .	0,35	0,30	300 u. a.-t.
Mulet 69 . . .	0,40	0,35	250 u. a.-t.
Mulet 61 . . .	0,90	0,45	Entre 10 et 100 u. a.-t.

Dosage du pouvoir antitoxique après une série d'injections d'anatoxine et deux injections de toxine diphtérique.

soumis à l'immunisation, mettant dans chaque groupe, à l'insu de nos collègues, deux animaux possédant un sérum fortement coagulant, et un troisième servant de témoin, ayant un sérum très peu coagulant; l'un de ces groupes fut immunisé avec la

toxine diphtérique par le Dr Lemos Monteiro et l'autre avec la toxine tétanique par notre collègue le Dr Paulo Marrey; dans ces deux groupes, les deux animaux possédant un sérum très coagulant se sont montrés bons producteurs d'antitoxine, en contraste avec le témoin dont le sérum n'atteignait qu'un très faible pouvoir antitoxique.

Par suite de circonstances indépendantes de notre volonté, nous n'avons pu accompagner plus loin ces deux observations; ces résultats suffisent cependant pour confirmer les premiers, montrant, malgré le choix d'un animal dont le sérum est normalement moins coagulant que celui du cheval, et le peu de durée de l'immunisation, que les individus possédant un sérum

Deuxième groupe, immunisé avec la toxine tétanique.

NUMÉRO des animaux	POUVOIR COAGULANT du sérum avant l'immunisation (en cent. cubes)	COAGULABILITÉ du plasma avant l'immunisation (en cent. cubes)	POUVOIR ANTITOXIQUE après l'immunisation
Mulet 35	0,40	0,35	Au-dessus de 1/10 u. a.-t.
Mulet 48	0,15	0,40	1/10 u. a.-t.
Mulet 60	0,80	0,35	Moins de 1/10 u. a.-t. Cobaye + 30 heures.

Dosage du pouvoir antitoxique du sérum après une série d'injections de toxine tétanique.

très coagulant sont, aussi bien avec la toxine diphtérique qu'avec la toxine tétanique, meilleurs producteurs d'antitoxine que ceux dont le sérum est peu coagulant.

Au contraire du pouvoir coagulant du sérum, la coagulabilité du plasma ne paraît garder aucun rapport constant avec les phénomènes d'immunité et ses variations toujours irrégulières ne nous ont permis aucune déduction pratique.

**APPLICATION PRATIQUE DE L'ÉTUDE DU POUVOIR COAGULANT DU SÉRUM
A LA SÉLECTION DES CHEVAUX DESTINÉS
A LA PRODUCTION DE SÉRUM ANTIDIPHTÉRIQUE.**

A la suite de ces premières études, nous avons systématiquement recherché le pouvoir coagulant du sérum afin de

sélectionner les animaux destinés aux services de sérum anti-diphétique et antitétanique. À notre Institut de Nietheroy, où actuellement ce procédé est en vigueur, nous avons ainsi examiné en deux mois environ 350 chevaux, dont 25 seulement ont été retenus pour le service de la diphtérie et 17 ont déjà été immunisés. Par suite du très petit nombre d'animaux possédant un sérum très coagulant, nous avons dû reculer sensiblement les limites indiquées par nos premières expériences, acceptant tous les chevaux dont l'index coagulant du sérum avec notre plasma étalon ne dépassait pas 0 c. c. 45 au lieu de 0 c. c. 35. Même ainsi, les résultats ont été très satisfaisants, tous les chevaux sélectionnés ayant fourni un sérum de pouvoir antitoxique suffisamment élevé, supérieur à 250 u. a. t., et très haut chez quelques-uns, tandis qu'avant cette sélection de nombreux chevaux, parfois des séries entières n'atteignaient pas 100 u. a.

Le tableau suivant, établi par le Dr Migueloto Vianna, chargé de la section de diphtérie de notre Institut de Nietheroy, résume les résultats de cette première sélection.

NUMÉRO des animaux	POUVOIR COAGULANT du sérum avant l'immunisation (en cent. cubes)	POUVOIR ANTITOXIQUE final
231.	0,45	300 u. a.-t.
232.	0,39	400 u. a.-t.
233.	0,40	300 u. a.-t.
234.	0,38	300 u. a.-t.
235.	0,40	600 u. a.-t.
236.	0,40	400 u. a.-t.
237.	0,39	300 u. a.-t.
238.	0,37	400 u. a.-t.
260.	0,36	300 u. a.-t.
261.	0,42	500 u. a.-t.
262.	0,38	350 u. a.-t.
264.	0,40	250 u. a.-t.
265.	0,38	300 u. a.-t.
266.	0,38	300 u. a.-t.
267.	0,38	Mort accidentelle avant la fin de l'immunisation.
268.	0,40	300 u. a.-t.
269.	0,36	200 u. a.-t.

Un seul cheval a fait exception, le n° 250, dont le sérum a

atteint un pouvoir antitoxique de 400 u. a. t. par centimètre cube malgré un pouvoir coagulant initial faible de 0 c. c. 60; il faut cependant remarquer que le pouvoir coagulant de cet animal s'est rapidement relevé dès le début de l'immunisation.

Toutes ces recherches confirment la relation existant entre le pouvoir coagulant du sérum et la capacité de formation d'anticorps : *tout cheval possédant un sérum très coagulant sera bon producteur d'antitoxine, tandis que les animaux dont le sérum est peu coagulant seront généralement mauvais producteurs.*

Cette relation n'est pas absolue, en ce sens que les petites variations de quelques centièmes de centimètres cubes existant entre divers sérums très coagulants ne permettent pas une classification rigoureusement correspondante de ces animaux comme producteurs d'antitoxine; trop de causes intrinsèques et extrinsèques peuvent influencer deux phénomènes aussi complexes que ceux de la coagulation et de l'immunité pour qu'il soit possible d'établir pour l'un ou pour l'autre des lois absolues; ce qui est intéressant à souligner, et sur quoi nous insistons, est la relation générale existant entre le pouvoir coagulant du sérum et la qualité de bon ou mauvais producteur d'anticorps, permettant, à l'aide d'un dosage rapide, de sélectionner les chevaux destinés à la production de sérum antidiptérique et anlitétanique et d'écartier les animaux sans valeur toujours trop nombreux dans les séries non sélectionnées.

Nous n'avons observé que peu d'exceptions à cette règle; quelques rares chevaux se sont montrés bons producteurs malgré un sérum initialement peu coagulant, mais nous n'avons pas encore observé de chevaux mauvais producteurs avec un sérum très coagulant. Ces quelques exceptions s'expliquent probablement par le grand nombre des facteurs pouvant modifier le pouvoir coagulant normal du sérum d'un individu, comme de nombreux états physiologiques ou pathologiques, l'absorption de diverses substances, etc.; il est possible que certaines de ces causes modifient le pouvoir coagulant du sérum sans en altérer les autres propriétés; cette hypothèse serait encore appuyée par le mode anormal d'après lequel le sérum de ces animaux exceptionnels réagit à l'immunisation au point

de vue de la coagulation, leur pouvoir coagulant s'élevant rapidement au lieu de s'abaisser initialement comme chez les animaux normaux. Ces exceptions sont d'ailleurs très rares et n'empêchent pas d'atteindre le but visé, la sélection rapide des animaux destinés à l'immunisation.

Conclusions.

1^o Quelle que soit l'hypothèse adoptée sur le mécanisme intime de la coagulation sanguine, l'étude de ce phénomène peut se ramener à deux faits principaux : le pouvoir coagulant du sérum, dans lequel se retrouvent les agents coagulants, et la coagulabilité du plasma qui contient les éléments coagulables du sang;

2^o La réaction *in vitro* du sérum sur le plasma est facile à suivre et la technique indiquée (emploi de sérum et de plasma étalons, fixation du temps et des autres conditions expérimentales) permet une étude détaillée et comparée des propriétés de sérum et de plasmas de diverses provenances;

3^o Le pouvoir coagulant d'un sérum dépend, d'une part de sa richesse en ferments coagulants, et d'autre part de la présence en plus ou moins grande quantité de substances anticoagulantes (antithrombine de Doyen, héparine d'Howell, anticoagulines, etc.), existant préformées dans le sang circulant et passant partiellement dans le sérum après la coagulation du sang.

La coagulabilité d'un plasma dépend de sa teneur en éléments coagulables (fibrinogène), et également de la présence des mêmes substances anticoagulantes dont l'action est susceptible de neutraliser en partie ou totalement celle de la thrombine du sérum ;

4^o Les sérum étudiés, appartenant aux groupes les plus divers de la série zoologique (37 espèces), se divisent en coagulants, inactifs et anticoagulants, suivant que l'action de leurs antithrombines est inférieure, égale, ou supérieure à celle de

leur thrombine. Les plasmas correspondants se divisent en coagulables et inhibiteurs, ces derniers très riches en antithrombines, ne se coagulant pas, même avec les sérum les plus fortement coagulants;

5° Il n'existe aucune relation entre les variations spécifiques ou individuelles du pouvoir coagulant du sérum et celle de la coagulabilité du plasma, et chez un même sujet peuvent coexister un sérum anticoagulant ou inactif et un plasma inhibiteur (ophidiens); ou un sérum inactif et un plasma coagulable (crocodile, tatou); ou un sérum coagulant et un plasma inhibiteur (crapaud, poulet); ou enfin un sérum coagulant et un plasma coagulable (la plupart des mammifères); il peut même arriver qu'un sérum ne coagule que peu ou pas le plasma homologue et soit beaucoup plus actif sur celui d'une espèce très éloignée plus riche en fibrinogène et contenant moins d'autithrombines (sérum de crapaud et plasmas de crapaud et de cheval);

6° Ces faits expliquent la différence profonde existant entre la coagulation spontanée rapide du sang des mammifères, toujours très instable, à peine sorti des vaisseaux, et celle très lente du sang des vertébrés inférieurs, oiseaux, reptiles, batraciens, qui sans adjonction de substances anticoagulantes se conserve fluide très longtemps dans les mêmes conditions, nécessitant l'action directe d'une substance étrangère, sucs de tissus ou autre, pour se coaguler rapidement;

7° Malgré de nombreuses variations individuelles, il est possible, par l'examen d'un certain nombre d'exemplaires de chaque espèce, d'établir des moyennes spécifiques assez régulières du pouvoir coagulant du sérum et de la coagulabilité du plasma, montrant généralement d'étroites relations entre espèces d'un même groupe zoologique et de profondes différences entre espèces de groupes différents, ainsi que l'indiquent les tableaux accompagnant ce travail;

8° Le pouvoir coagulant du sérum et la coagulabilité du plasma sont modifiés par de nombreux facteurs : présence de certains sels, de lipoïdes, la concentration et la réaction du milieu,

divers états physiologiques, etc.; l'âge et le sexe n'exercent pas d'action régulière, mais les variations quantitatives des diverses fractions protéiniques du milieu sanguin paraissent avoir une certaine influence sur la coagulation sanguine;

9° Les phénomènes d'immunité gardent une relation étroite avec les variations du pouvoir coagulant du sérum, mais non avec celles de la coagulabilité du plasma.

L'étude chez 37 chevaux du pouvoir coagulant du sérum avant l'immunisation, comparée avec le dosage du pouvoir antitoxique du sérum atteint par ces animaux immunisés contre la toxine diphtérique ou la toxine téstanique, a montré que les chevaux possédant un sérum de pouvoir coagulant initial élevé sont bons producteurs d'antitoxine, tandis que ceux dont le sérum est peu coagulant ne fournissent généralement qu'un sérum de titre antitoxique faible.

L'étude préliminaire du pouvoir coagulant du sérum permet ainsi de sélectionner rapidement les chevaux destinés à la production de sérums antidiplhtérique ou antitéstanique.

PRINCIPAUX AUTEURS CITÉS

- [1] VOSBURGH et RICHARDS. *Amer. Journ. of Physiology*, **9**, 1903, p. 35.
- [2] CANNON et MENDENHALL. *Amer. Journ. of Physiology*, **34**, 1914, p. 225-243; CANNON et GRAY. *Amer. Journ. of Physiology*, **34**, 1914, p. 232.
- [3] DELEZENNE. *C. R. Soc. Biologie*, **49**, 1897, p. 42; *ibid.*, p. 228; *ibid.*, p. 507; *ibid.*, **50**, 1898, p. 354 et 427.
- [4] HOWELL. *Amer. Journ. of Physiology*, 1910; *ibid.*, 1914; *ibid.*, 1925; Congrès de Physiologie d'Edimbourg. *Archiv. of intern. Med.*, **13**, 1914, p. 76.
- [5] DOYON. Nombreuses communications dans les *C. R. Soc. Biologie* de 1902 à 1926 en collaboration avec MOREL, POLICARD et VIAL; consulter: *Traité de Physiologie normale et pathologique* (ROGER). Paris, **7**, 1927, p. 141-165.
- [6] NOLP. *Archiv. intern. de Phys.*, **4**, 1906-1907,
- [7] ABELOUS et BILLARD. *C. R. Soc. Biol.*, 1897; BILLARD. *C. R. Soc. Biol.*, 1910; ARGAUD et BILLARD. *C. R. Soc. Biol.*, **71**, 1914, p. 583; BILLARD. *C. R. Soc. Biol.*, **72**, 1912, p. 203.
- [8] CUÉNOT. *Traité de Physiologie normale et pathologique* (ROGER). Paris, **7**, 1927, p. 165.
- [9] MOSSO. *Archiv. ital. de Phys.*, **10**, 1888, p. 141.
- [10] CAMUS et GLEY. *C. R. Soc. Biol.*, **50**, 1898, p. 3.
- [11] HOUSSAY, SORDELLI et NEGRETTE. *Revue del Inst. Bact. de Buenos Aires*, **1**, n° 5, p. 565.

- [12] BORDET et GENGOU. *Ces Annales*, 1901 ; *ibid.*, 1903 ; BORDET et DELANGE. *Bull. Soc. royale des Sc. méd. et nat. de Bruxelles*, 1912 et 1914 ; *Ces Annales*, 1912 et 1913 ; BORDET. *Ces Annales*, 1920.
- [13] CAMUS. *C. R. Acad. Sciences*, 1901.
- [14] GRAM. *Journ. of Biol. Chem.*, **60**, 1921, p. 278 ; *ibid.*, 1924.
- [15] Edgard ZUNZ. *C. R. Soc. Biol.*, **93**, 1925, p. 865.
- [16] Edgard ZUNZ et Jean LA BARRE. *Archiv. int. de Phys.*, **25**, 1925, p. 221 ; *C. R. Soc. Biologie*, **93**, 1925, 28, p. 867 et 1042 ; JEAN LA BARRE. *Archiv. int. de Phys.*, **25**, 1925, p. 265.
- [17] MORAWITZ. *Handbuch der Chemie d. Menschen u. d. Tiere*, **4**, 1925.
- [18] MILLS et MATHEWS. *Archiv. int. de Phys.*, 1924 ; MATHEWS. *Physiological chemistry*, New-York, 1925.
- [19] T. B. ROBERTSON. *Journ. Biol. Chem.*, **13**, 1912-1913, p. 325.
- [20] HAMMARSTEN. *Archiv. f. d. ges. Phys.*, **17**, 1878, p. 459.
- [21] LEWINSKI. *Archiv. f. d. ges. Phys.*, **100**, 1903, p. 611.
- [22] IGANAKI. *Zeit. f. Biol.*, **49**, 1907.
- [23] HISS et ATKINSON. *Journ. exp. Med.*, **5**, 1900, p. 47.
- [24] LEDINGHAM. *Journ. Hyg.*, **7**, 1907, p. 65.
- [25] Maurice PIETRE. *Archiv. do Instituto Vital Brazil*, **1**, 1923, p. 26 ; *ibid.*, **2**, 1924, p. 171.
- [26] GIBSON et BANZHAF. *Journ. exp. Med.*, **42**, 1920, p. 411.
- [27] BANZHAF, SUGIURA et FALK. *New York City Depart. of Health Studies*, **18**, 1914-1915, p. 213.
- [28] KIRKBRADE (M. B.) et MURDICK (P. P.). *Journal of Immunology*, **14**, 1927, n° 4, p. 235.
- [29] VITAL BRAZIL et J. VELLARD. *Brazil-Medico*, mai 1926 ; *Boletin do Instituto Brasileiro de Sciences*, **2**, 1926, p. 195 ; *Rev. da Soc. de Biol. e Hyg. d. São Paulo*, **1**, 1927, 1, p. 5 ; *Ces Annales*, 1928.

ÉTUDE COMPARÉE SUR LA RÉINFECTION INTRAPÉRITONÉALE CHEZ LE COBAYE TUBERCULEUX ET CHEZ LE COBAYE PRÉMUNI PAR LE BCG

par M. E. RIST (Paris) et M^{me} J. MISIEWICZ (Varsovie).

(Travail du Laboratoire du Dr E. Rist à l'Hôpital Laennec.).

La réinfection intrapéritonéale permet d'étudier commodément l'immunité relative acquise par le cobaye à la suite d'une première infection tuberculeuse. L'un de nous a jadis montré, avec J. Rolland et M. Léon Kindberg (1), que la réinfection par cette voie n'a jamais pour conséquence la production de tubercules sur la surface de la séreuse, alors que l'inoculation péritonéale, chez le cobaye neuf, détermine toujours, même à très faible dose, une péritonite tuberculeuse typique caractérisée par la présence de tels tubercules.

D'autre part, la réinfection péritonéale, lorsqu'elle est faite avec des quantités importantes de bacilles (0 gr. 01 à 0 gr. 02 de bacilles pesés à sec) détermine des accidents presque immédiats de péritonite hémorragique, évoluant au milieu de phénomènes de choc et déterminant la mort de l'animal dans un délai de cinq à vingt-quatre heures. Mais certains animaux guérissent de cette « péritonite allergique » et survivent alors, sans que la réinfection abrège la durée de la tuberculose due à leur primo-infection. Pour peu que celle-ci n'ait pas été trop sévère, ils survivent même plus longtemps que des cobayes neufs primo-infectés dans le péritoine à la même dose. Nous nous sommes demandé si l'immunité procurée par le BCG ne pouvait pas être étudiée par les mêmes méthodes, et si, de la comparaison entre les résultats de la réinfection intrapéri-

(1) E. RIST, J. ROLLAND et M. LÉON KINDBERG, Études sur la réinfection tuberculeuse. *Annales de Médecine*, 1914, 1, p. 310-335 et 375-395.

tonéale chez des cobayes primo-inoculés avec des bacilles virulents d'une part, et avec du BCG d'autre part, on ne pourrait pas tirer quelque enseignement. On sait d'ailleurs que la prémunition provoquée chez le cobaye par le BCG est toute relative. « Elle n'est, dit Calmette, jamais durable. Elle ne produit des effets protecteurs vis-à-vis des infections expérimentales que pendant quelques semaines, ou, au plus, quelques mois (1). » Mais est-elle plus durable que l'immunité relative procurée par une primo-infection virulente, et, dans ces limites de durée, plus efficace ? Cette question n'est pas dépourvue d'intérêt doctrinal, et pourtant elle n'avait pas été abordée jusqu'ici, croyons-nous.

I. — Primo-inoculation.

Nous avons préparé 30 cobayes par une primo-inoculation avec des bacilles virulents et 23 cobayes par une primo-inoculation avec des bacilles biliés BCG.

1^o *Primo-inoculations virulentes.* — Chacun de nos 30 cobayes a reçu sous la peau de l'aine 0 gr. 001 d'une culture de bacilles tuberculeux humains virulents (souche Ratti, de l'Institut Pasteur), sur milieu synthétique de Sauton, âgée de douze jours. Nos animaux ont été observés durant une période de trente-huit jours, s'étendant du jour de la primo-inoculation à celui de la réinfection; 12 cobayes sont morts dans cet intervalle : 7 d'entre eux ont succombé du huitième au treizième jour après l'inoculation. Leur autopsie a montré de nombreux nodules blancs disséminés à la surface de la rate et dans le parenchyme hépatique et des foyers de suppuration dans les ganglions mésentériques. L'ensemencement en bouillon du pus de ces abcès nous a donné des cultures pures du cocco-bacille de la pseudo-tuberculose des rongeurs de Vignal et Malassez. Sur 7 cobayes, 5 avaient, sans lésions macroscopiques tuberculeuses décelables, des bacilles acido-résistants dans les ganglions inguinaux, mésentériques et trachéo-bronchiques.

(1) A. CALMETTE, *L'infection bacillaire et la tuberculose.* Masson, Paris, 3^e édit., 1928, p. 798.

5 autres cobayes ont succombé du quinzième au trente-sixième jour à la tuberculose généralisée ; dans toutes leurs lésions macroscopiques, il y avait de nombreux bacilles acido-résistants ; 2 parmi ces animaux présentaient en outre des lésions de pseudotuberculose.

Il nous restait donc, sur les 30 animaux primo-inoculés, 18 cobayes préparés pour la réinfection au trente-neuvième jour. Tous avaient subi l'épreuve de l'intradermo-réaction à la tuberculine au dixième et au vingtième jour, suivant la primo-inoculation : 0,1 c. c. d'une dilution au 1/10 de tuberculine brute dans la peau de l'abdomen. Au dixième jour l'intradermo-réaction s'est montrée positive chez 17 cobayes, et négative chez 9 (sur les 30 animaux, 4, morts préocurement, n'ont pu subir cette épreuve). Au vingtième jour, 16 cobayes ont eu une intradermo-réaction positive ; chez 11 d'entre eux, il s'est même produit un véritable phénomène de Koch.

Chez tous nos cobayes, sauf ceux qui sont morts préocurement de pseudo-tuberculose, nous avons vu se former du quinzième au vingt-sixième jour un chancre d'inoculation avec adénopathie similaire, persistant jusqu'à la fin de nos expériences.

Sur les 18 cobayes restant disponibles pour la réinfection, 12 avaient perdu du poids (entre 12 et 188 grammes) ; 6 autres animaux avaient légèrement augmenté de poids (entre 3 et 77 grammes).

2^o *Primo-inoculation avec le BCG.* — Nous avons inoculé 23 cobayes, dont chacun reçut sous la peau de l'aine 1 c. c. de vaccin BCG frais provenant du laboratoire de M. Calmette à l'Institut Pasteur. Cette dose correspond à 0 gr. 005 de bacilles BCG. Les animaux ont été, comme ceux du lot précédent, observés pendant une période de trente-huit jours s'étendant du jour de la primo-inoculation à celui de la réinfection : 8 cobayes sont morts du sixième au trentième jour après la primo-inoculation ; 7 d'entre eux ont succombé à la pseudotuberculose Vignal-Malassez ; 1 seul (mort le vingt-deuxième jour) n'a présenté aucune lésion à l'autopsie ; ses ganglions ne contenaient pas de bacilles acidorésistants. Au contraire, les 6 cobayes morts de pseudotuberculose du sixième au dix-huitième jour avaient des bacilles acidorésistants dans leurs gan-

glions. Mais, malgré des recherches persévérandes sur de nombreux frottis, conformément à la technique usitée dans les études sur les éléments filtrables du bacille tuberculeux, nous n'avons pu en déceler dans les ganglions des 2 cobayes morts le vingt-deuxième jour (autopsie négative) et le trentième jour (pseudotuberculose).

Tous les cobayes de ce lot ont présenté une légère augmentation de volume du ganglion inguinal correspondant au lieu de l'inoculation ; elle s'est montrée du sixième au dixième jour pour disparaître, en général, du quinzième au trentième jour. Chez 5 animaux, cette tuméfaction du ganglion inguinal a persisté au delà du trente-huitième jour et a même augmenté un peu après réinfection.

L'intradermo-réaction à la tuberculine faite le dixième jour a été positive sur 10 animaux et négative sur 10. Faite au vingtième jour, elle a été positive sur 15 et négative sur 5. Notons au passage que chez 3 animaux elle est devenue négative au vingtième jour, après avoir été positive au dixième.

A l'exception des cobayes qui succombèrent à la pseudotuberculose, les animaux primo-inoculés avec le BCG conservèrent tous une excellente santé durant la période d'observation. Sur les 15 animaux restant disponibles pour l'épreuve de réinfection, 12 avaient augmenté de 5 à 155 grammes ; 3 avaient perdu de 15 à 20 grammes.

II. — Réinfection.

Nos animaux préparés soit par une primo-inoculation virulente, soit par une primo-inoculation au BCG, ont tous été réinfectés le trente-neuvième jour par la voie intrapéritonéale. Les bacilles humains virulents injectés dans le péritoine en émulsion dans 10 c. c. d'eau physiologique appartenaient à la même souche Ratti qui nous avait déjà servi pour nos primo-inoculations virulentes ; ils provenaient d'une culture sur pomme de terre âgée de trente jours. Nous avons réparti nos cobayes en trois séries, suivant la dose de réinfection.

Ceux de la série I ont été réinfectés avec 0 gr. 01.

Ceux de la série II ont été réinfectés avec 0 gr. 001.

Ceux de la série III ont été réinfectés avec 0 gr. 0001.

Chaque série contient trois groupes d'animaux :

a) Cobayes neufs, n'ayant pas subi de primo-inoculation et servant de témoins de la virulence de l'émulsion injectée dans le péritoine ;

b) Cobayes primo-inoculés sous la peau de l'aine avec des bacilles virulents ;

c) Cobayes primo-inoculés sous la peau de l'aine avec des bacilles BCG.

Outre ces trois séries, nous avons gardé encore deux lots de cobayes non réinfectés :

Série IV : 4 cobayes ayant reçu une primo-inoculation virulente sous la peau de l'aine et servant de témoins à la survie des cobayes primo-inoculés et réinfectés.

Série V : 3 cobayes primo-inoculés avec le BCG et non réinfectés.

Le liquide péritonéal a été prélevé par ponction trois heures et demie après injection de l'émulsion de bacilles, chez tous les animaux, et examiné sur des frottis colorés par la méthode de Ziehl-Neelsen. Dans le liquide des animaux du groupe *a*, cobayes neufs, primo-inoculés dans le péritoine, les bacilles étaient presque tous phagocytés par les leucocytes et n'offraient aucune altération morphologique ou tinctoriale. Au contraire, dans les exsudats provenant des cobayes du groupe *b* (primo-inoculés par des bacilles virulents), les bacilles ayant servi à la réinfection intrapéritonéale étaient pour le plus grand nombre extra-cellulaires et les figures de phagocytose étaient rares. L'aspect granuleux, fragmenté, poussiéreux, et la teinte grenat plutôt que rubis des bacilles, s'observaient de la façon la plus nette. Les liquides provenant des cobayes du groupe *c* (primo-inoculation par le BCG) avaient exactement le même aspect que ceux du groupe *b* : bacilles pour la plupart extracellulaires et présentant l'aspect que, dès 1914, l'un de nous, avec Léon-Kindberg et J. Rolland, avait interprété comme témoignant d'une bactériolyse.

Les autopsies de tous nos cobayes ont fait constater des lésions très différentes suivant que l'inoculation intrapéritonéale avait été une primo-infection ou une réinfection. Les cobayes neufs, primo-inoculés dans le péritoine avec des

bacilles virulents (groupe *a*), succombèrent tous à des péritoites tuberculeuses. Dans tous les cas, nous avons trouvé un exsudat abondant, de nombreux tubercules à la surface de la séreuse et, chez les animaux ayant survécu jusqu'au delà du douzième jour, des symphyses entre les viscères et le péritoine pariétal.

Au contraire, les cobayes du groupe *a* (primo-infection virulente sous-cutanée, réinfection péritonéale) présentaient à l'autopsie des lésions de tuberculose généralisée ; on trouvait de nombreux tubercules dans le foie, la rate, les ganglions, les poumons, *mais il n'y avait point de péritonite tuberculeuse*. A cela, qui confirme en tous points nos expériences antérieures, une seule exception : un cobaye tuberculeux, réinfecté dans le péritoine avec 0 gr. 01, mourut vingt jours après et présenta à l'autopsie une péritonite tuberculeuse typique avec exsudat abondant et une pleurite tuberculeuse bilatérale.

Les cobayes du groupe *c* (primo-inoculation sous-cutanée par le BCG) ont, comme ceux du groupe *b*, présenté à l'autopsie des lésions de tuberculose viscérale généralisée, sans péritonite tuberculeuse. A ce point de vue, ils réagissent donc à la réinfection intrapéritonéale, non pas comme des animaux neufs, mais comme des animaux déjà tuberculeux.

Si maintenant nous comparons la *survie* des différents groupes à la réinfection tuberculeuse virulente, nous arrivons à des résultats fort intéressants. Analysons-les dans chacune des trois séries que nous avons établies selon l'importance de la dose réinfectante :

SÉRIE I. — DOSE RÉINFECTION : 0 GR. 01.

Les 4 cobayes *A* (témoins neufs) ont survécu respectivement treize jours, seize jours, seize jours et dix-huit jours. Survie maxima dix-huit jours.

Des 4 cobayes *b* (tuberculeux réinfectés), 2 sont morts en douze heures de choc allergique. La description de ces morts aiguës a été donnée et longuement commentée dans le mémoire de Rist, Kindberg et Rolland de 1914 ; nous n'y reviendrons pas. Un troisième succomba le dixième jour. Le quatrième survécu vingt-trois jours ; c'est celui à l'autopsie duquel on

constata une tuberculose généralisée avec péritonite tuberculeuse et pleurite bilatérale. Survie maxima vingt-trois jours

Les 4 cobayes *c* (prémunis par le BCG) survécurent plus longtemps que les cobayes neufs et que les cobayes tuberculeux. Ce n'est, en effet, que le vingt et unième jour que nous perdîmes le premier cobaye de ce lot, à une date où tous les cobayes *a* et 3 sur 4 parmi les cobayes *b* avaient succombé. Le deuxième mourut le vingt-quatrième jour, le troisième le vingt-cinquième jour et le quatrième le trentième jour. Survie maxima trente jours.

SÉRIE II. — DOSE RÉINFECTION : 0 GR. 001.

Les 4 cobayes *a* sont morts respectivement le huitième, le seizième, le dix-huitième et le vingt-et unième jour.

Les 5 cobayes *b* survécurent respectivement jusqu'au neuvième, au dixième, au vingtième, au vingt-septième et au trentième jour.

Parmi les 4 cobayes *c*, le premier succomba le trente-deuxième jour, c'est-à-dire alors que tous les cobayes des groupes *a* et *b* correspondants étaient déjà morts. Le deuxième vécut jusqu'au trente-sixième jour, le troisième jusqu'au trente-neuvième et le quatrième jusqu'au quarante-septième.

L'influence protectrice de la primo-inoculation par le BCG est déjà beaucoup plus évidente. Elle l'est davantage encore dans la série suivante.

SÉRIE III. — DOSE RÉINFECTION : 0 GR. 0001.

Les 4 cobayes *a* succombent respectivement dix-neuf, vingt-sept, vingt-sept et vingt-neuf jours après inoculation intrapéritonéale.

Les 5 cobayes *b* ont, après réinfection intrapéritonéale, une survie appréciable : vingt-trois, vingt-neuf, trente-cinq, trente-huit et quarante-quatre jours.

Parmi les 4 cobayes *c*, le premier a succombé le soixante-cinquième jour, alors que le dernier cobaye *a* était mort depuis trente-six jours et le dernier cobaye *b* depuis vingt et un jours. Le deuxième cobaye *c* mourut le soixante-neuvième jour. Il

présentait, comme son congénère, des lésions de tuberculose viscérale généralisée. Les deux derniers cobayes de ce groupe vivaient encore le soixante-dix-septième et le soixante-dix-neuvième jour après l'inoculation intrapéritonéale. Nous les avons sacrifiés; ils présentaient des lésions relativement discrètes. La rate était hypertrophiée et contenait d'assez nombreux tubercules. Il y avait quelques tubercules miliaires dans le foie. Les poumons étaient indemnes. Les ganglions mésentériques étaient hypertrophiés, mais non casseux. L'épiploon était tassé, durci et contenait des abcès casseux.

Voyons maintenant les témoins :

SÉRIE IV.

COBAYES AYANT REÇU UNE INOCULATION SOUS-CUTANÉE VIRULENTÉ ET NON RÉINFECTIONNÉS.

Les 4 cobayes de cette série ont survécu respectivement quarante-neuf, soixante-douze, soixante-quinze et quatre-vingt-huit jours. Ils avaient reçu une dose de 0 gr. 001. Leur survie remarquable, par rapport aux groupes *a* des séries II et III, qui avaient été primo-infectés dans le péritoine aux doses respectives de 0 gr. 001 et de 0 gr. 0,0001, démontre une fois de plus ce fait bien connu depuis longtemps que la voie péritonéale est beaucoup plus sévère que la voie sous-cutanée. Mais il est intéressant de comparer leur sort à celui des cobayes des groupes *b* qui, primo-inoculés sous la peau à cette même dose de 0 gr. 001, ont été ensuite réinfectés dans le péritoine. Si l'on met à part les deux cobayes *b* de la série I qui ont succombé en moins de vingt-quatre heures au choc allergique, on voit que la survie de ces cobayes *b* est du même ordre de grandeur que celle des cobayes non réinfectés. En d'autres termes, la réinfection n'a pas abrégé leur survie, ni aggravé leur infection. Elle s'est montrée en quelque sorte inefficace. D'un point de vue un peu différent, on peut dire aussi que la primo-inoculation virulente sous-cutanée les a protégés contre l'effet d'une réinfection intrapéritonéale ultérieure.

SÉRIE V.

COBAYES INOCULÉS SOUS LA PEAU AVEC LE BCG
ET N'AYANT PAS SUBI DE RÉINFECTION ULTÉRIEURE.

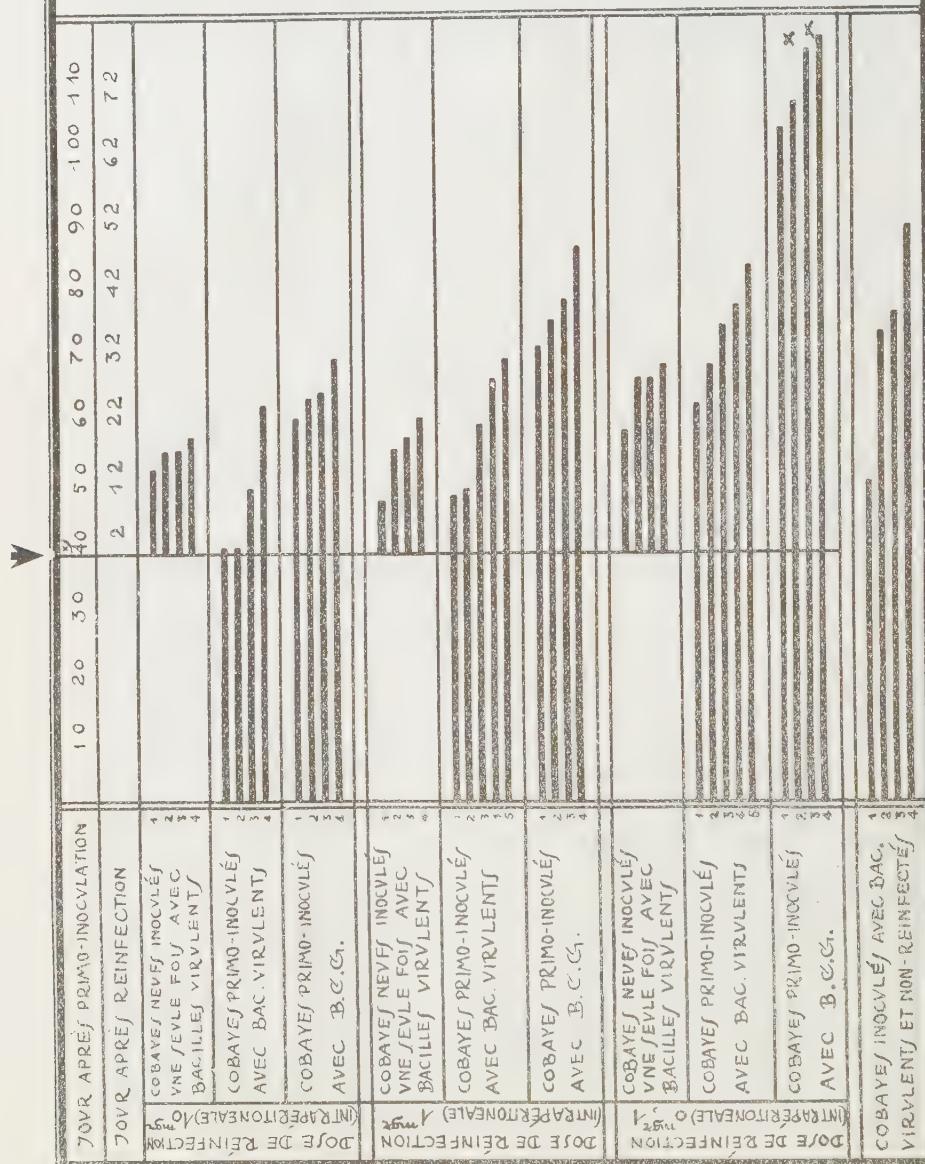
Les 3 cobayes de ce lot sont restés vivants et en bonne santé pendant toute la durée de l'expérience. Ils ont assez notablement augmenté de poids. Nous les avons sacrifiés le cent douzième jour après leur prémunition. L'autopsie n'a fait constater aucune lésion et, malgré les recherches les plus persévérandes, nous n'avons pu déceler de bacilles acido-résistants sur les frottis de leurs ganglions lymphatiques et de leurs viscères. Parmi ces 3 cobayes se trouvait une femelle pleine ; après l'avoir sacrifiée, nous avons trouvé dans son utérus 4 embryons d'une longueur de 2 centimètres. Sur des frottis du foie, de la rate et du placenta de ces embryons, il nous a été impossible de déceler des bacilles acido-résistants.

Le tableau ci-après schématise les résultats de l'expérience. Les barres horizontales y figurent par leur longueur la durée, en jours, de la survie après primo-inoculation, pour chaque animal. Le trait vertical marqué d'une flèche indique la réinfection faite le trente-huitième jour.

Dans chaque série, le groupe des témoins A primo-inoculés dans le péritoine ne prend date qu'à partir du jour où les animaux en expérience ont été réinfectés.

On peut, croyons-nous, conclure de ces faits que l'immunité relative conférée au cobaye par une primo inoculation sous-cutanée virulente et celle que lui procure une primo-inoculation sous-cutanée par le BCG paraissent, lorsqu'on les éprouve au moyen de la réinfection virulente intra-péritonéale, être de même nature : les réactions immédiates, inhibition de la phagocytose, altération de la morphologie et de la tingibilité des bacilles injectés, sont les mêmes ; et, ni dans l'un, ni dans l'autre cas, il ne se développe de tubercules sur la surface du péritoine. Seul le choc allergique mortel n'a pas été observé par nous chez les animaux prémunis par le BCG ; mais il sied de remarquer que chez les animaux tuberculeux il ne se produit qu'avec des doses réinfectantes très élevées ; et, d'autre part, nous n'avons pas cherché si, en élevant plus

DUREE DE LA VIE DES COBAYES PRIMO-INOCVLES AVEC
LES BACILLES TUBERCULEUX VIRVLENTS OU AVEC LES
BACILLES B.C.G. ET REINOCVLES AVEC LES BAC.VIRVLENTS



encore la dose, il ne serait pas possible de produire le choc allergique mortel chez le cobaye prémunie par le BCG.

La primo-inoculation virulente protège le cobaye d'une façon certaine — encore que relative — contre les effets de la réinfection péritonéale (phénomènes de choc mis à part) et elle confère à l'animal une survie appréciable. Mais la protection que donne la prémunition par le BCG, pour être de même nature, n'est pas du même degré. Elle est beaucoup plus durable, et, bien que relative elle aussi, beaucoup plus solide.

**SUR LES CONDITIONS D'EMPLOI
DE LA VACCINATION BCG PAR VOIE SOUS-CUTANÉE
CHEZ LES SUJETS DE TOUS AGES
NE RÉAGISSANT PAS A LA TUBERCULINE**

par J. HEIMBECK (Oslo).

Nous avons précédemment publié dans ces *Annales* (1) une note relative à la vaccination par le BCG des sujets adultes, à culituberculisation négative. Il s'agissait d'élèves-infirmières de l'hôpital Ulleval, d'Oslo. Nous avons montré qu'il est possible de conférer, à celles de ces élèves qui ne réagissaient pas à la tuberculine avant de commencer leur stage dans les services hospitaliers de tuberculeux, une résistance manifeste à la contagion tuberculeuse en leur inoculant sous la peau une faible dose (par exemple 1/20 de milligramme) de BCG. A la suite de cette inoculation, elles réagissent positivement à la tuberculine et se trouvent alors dans les mêmes conditions de défense naturelle contre l'infection bacillaire que les élèves-infirmières qui réagissaient positivement à la tuberculine lors de leur admission à l'école.

D'après ce que nous avons observé, il semble que, dans les conditions de notre expérience, il soit essentiel, pour la vaccination au BCG par injection sous-cutanée, que le sujet à vacciner ne réagisse pas à la tuberculine.

Or, s'il est exact, comme on le croit généralement, que l'infection tuberculeuse, donc la sensibilisation à la tuberculine, est très souvent réalisée dès la première enfance, bien peu de sujets, si l'on excepte les nouveau-nés, seraient en mesure de bénéficier de la vaccination au BCG.

Heureusement, du moins en Norvège, le nombre des enfants et même des adultes qui réagissent positivement à la tuberculine est, ainsi que nous avons pu le constater, et dans tous

(1) Ces *Annales*, février 1928.

les milieux sociaux, très inférieur à ce que nous pensions.

Nous avons procédé à nos examens pendant toute une année, de juillet 1927 à juin 1928, d'une part à Oslo, d'autre part, dans un district rural isolé, loin du chemin de fer.

La technique employée fut celle de Pirquet, légèrement modifiée en ce sens que nous opérons par scarification simple, sans produire de traumatisme. Nous avons divisé nos sujets en :

Population rurale, population ouvrière citadine et classe moyenne des villes.

Voici les résultats de nos tuberculisations :

Tableau I. — Population ouvrière citadine (Oslo), 1.163 sujets.

AGE	NOMBRE de sujets examinés	RÉACTIONS positives à la tuberculine	POURCENTAGE
0 à 3 ans	24	6	27
4 à 6 ans	70	25	36
7 à 9 ans	62	19	31
10 à 12 ans.	96	40	38
13 à 15 ans.	125	70	56
16 à 18 ans.	117	81	70
19 à 21 ans.	150	127	85
22 à 24 ans.	135	117	88
25 à 27 ans.	120	115	96
28 à 30 ans.	84	80	99
31 à 40 ans.	140	137	98
41 à 50 ans.	34	34	100
51 à 80 ans.	9	9	100

Tableau II. — Classe moyenne des villes (Oslo), 534 sujets.

AGE	NOMBRE de sujets examinés	RÉACTIONS positives à la tuberculine	POURCENTAGE
0 à 3 ans	28	4	15
4 à 6 ans	53	9	17
7 à 9 ans	38	9	24
10 à 12 ans.	34	9	26
13 à 15 ans.	26	4	15
16 à 18 ans.	37	8	22
19 à 21 ans.	124	59	48
22 à 24 ans.	54	30	55
25 à 27 ans.	33	27	82
28 à 30 ans.	23	20	87
31 à 40 ans.	58	55	95
41 à 50 ans.	18	18	100
51 à 80 ans.	8	7	87

Tableau III. — Population rurale en 1927, 608 sujets.

ÂGE	NOMBRE de sujets examinés	RÉACTIONS positives à la tuberculine	POURCENTAGE
0 à 5 ans	39	10	25
6 à 10 ans.	53	9	17
11 à 15 ans.	48	14	29
16 à 20 ans.	44	15	34
21 à 25 ans.	246	108	44
26 à 30 ans.	29	17	59
31 à 35 ans.	30	22	74
36 à 40 ans.	27	24	88
41 à 50 ans.	50	38	76
51 à 80 ans.	42	32	76.

Le nombre des sujets soumis à l'épreuve de la tuberculine étant relativement peu élevé, nos chiffres n'ont rien d'absolu et devront sans doute être modifiés lorsque les examens auront été plus nombreux. Mais il apparaît clairement que les conditions qui réalisent l'infection tuberculeuse sont très différentes, suivant les catégories sociales, et que cette infection se produit très souvent au cours de la seconde enfance, ou même vers la vingtième année, surtout dans les classes moyennes.

Cette constatation ouvre un champ étendu à l'emploi de la vaccination préventive au moyen du BCG par injection sous-cutanée (non seulement pour la prémunition des enfants qui ont dépassé l'âge de dix jours sans avoir été vaccinés par voie buccale, mais aussi pour celle des enfants de tous âges et des adolescents, beaucoup plus souvent atteints qu'on ne l'avait cru jusqu'ici par l'infection primaire et parmi lesquels la tuberculose fait un si grand nombre de victimes).

Par cette note préliminaire nous nous proposons seulement d'attirer l'attention sur l'intérêt considérable que présente l'étude approfondie de ce problème.

Le Gérant : G. MASSON.

